



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

Trabajo de Tesis Doctoral

**Monocapas Autoensambladas de**  
**Alcanotioles y  $\alpha,\omega$ -alcanoditioles sobre Oro:**  
**Adsorción no específica de Moléculas Bioactivas,**  
**Biomoléculas y Vesículas**

---

Tesista: María Antonieta Daza Millone

Director: Roberto C. Salvarezza

Co-directora: María Elena Vela

2011

El presente trabajo de Tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Roberto C. Salvarezza y la co-dirección de la Dra. María Elena Vela en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). El mismo se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP para acceder al título de Doctora de la Facultad en el Área de Química.

*A Walter “Coco” Millone y  
a Pedro “Yeye” Aymonino”*

# Agradecimientos

Quisiera expresar mi gratitud a aquellas personas con quienes compartí estos últimos años en los cuales realicé este trabajo de Tesis.

En primer lugar, a mi adorada familia, en especial a mi mamá Elena, y a mis amigas Mariela y Carolina. Gracias por apoyarme en mi vocación y siempre estar a mi lado, tanto en los festejos como en los momentos de zozobra emocional.

Esta odisea científica no hubiera comenzado sin la confianza que me brindó el Dr. Mariano Fonticelli, quien me introdujo al mundo de la investigación y con quien siempre conté para consejos y discusiones de gran valor para mi progreso profesional. Gracias a él conocí al Dr. Roberto C. Salvarezza y a la Dra. María Elena Vela, a quienes no sólo admiro y respeto por su capacidad laboral sino por su calidez humana. Como mis directores, supieron guiarme con paciencia, alentándome a desarrollar mis propias ideas. Espero que las enseñanzas que recibí de ellos perduren en mí en los años venideros.

Sin duda no hubiera podido llevar este trabajo a término sin la financiación de la beca de CONICET. Además, fui beneficiada en varias ocasiones por distintas entidades para asistir a congresos, escuelas y para realizar estadías de investigación, las cuales contribuyeron enormemente a mi formación y a la calidad de los resultados obtenidos. A todas ellas (ANPCyT, UNLP, AAFIQ, CNPq, NSF, etc.) les estoy muy agradecida.

Me siento muy afortunada de haber contado con un increíble grupo de trabajo en el INIFTA, que poco a poco fue creciendo y con quienes siempre conté con su desinteresada ayuda: Aldo Rubert, Guillermo Benítez, Carolina Vericat, Federico Castez, Bárbara Blum, Doris Grumelli, Patricia Schilardi, Francisco Ibáñez, Cecilia dos Santos Claro, Emiliano Cortés (gran compañero de viajes), Evangelina Pensa, Constanza Flores, Alejandra Floridia, Gastón Corthey, Julio Azcárate, Matías Calderón, Alejandro Ramírez, Álvaro Carrera, Carolina Díaz y Agustín Picco (compañero por adopción). A su vez, quisiera agradecer al personal técnico y administrativo del instituto por su continua asistencia.

Además tuve la gran posibilidad de realizar mi trabajo en colaboración con distintos grupos de otras disciplinas, quienes me recibieron en repetidas oportunidades con buena predisposición y gran amabilidad:



- El grupo del Dr. André Pasa y la Dra. Tânia Creczynski-Pasa de la UFSC (Brasil), en especial al Dr. Maximiliano Munford y a la Dra. Mauricia Beddin Fritzen.
- El grupo del Dr. Oscar Grizzi del CAB (Bariloche), en especial al Lic. Luis Rodríguez y al Dr. Esteban Gayone.
- El grupo del Dr. Alejandro Fainstein del CAB (Bariloche), en especial al Dr. Nicolás Tognalli.
- El grupo del Dr. Bruno Maggio del CIQUIBIC-UNC (Córdoba), en especial al Dr. Rafael Oliveira y a la Dra. Natalia Wilke.
- El grupo de la Dra. Lelia DiCelio del INQUIMAE (Buenos Aires), en especial a la Ing. Virginia Diz.

Por último quisiera agradecer a mis compañeros de viaje de Buenos Aires a La Plata, con quienes afrontamos una nueva aventura cada día.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen .....	iii
Lista de símbolos y abreviaciones .....	iv
Capítulo 1: Introducción general .....	1
1.1 Nanociencia y nanotecnología .....	3
1.2 Sistemas biomiméticos .....	5
1.3 Objetivos de esta tesis .....	7
1.4 Referencias .....	7
Capítulo 2: Técnicas experimentales .....	9
2.1 Métodos electroquímicos .....	11
2.2 Microscopías de barrido por sondas .....	18
2.2.1 Microscopía de barrido por Efecto Túnel (STM) .....	20
2.2.2 Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM) .....	28
2.3 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) .....	42
2.4 Espectroscopía Raman amplificada por superficies (SERS) .....	50
2.5 Balanza de Langmuir-Blodgett .....	58
2.6 Bibliografía .....	70
Capítulo 3: Autoensamblado de alcanotioles y $\alpha,\omega$ -alcanoditioles sobre oro .....	72
3.1 Introducción .....	74
3.2 Experimental .....	84
3.3 Alcanotioles .....	89
3.4 Alcanoditioles .....	96
3.5 Ditiotreitól .....	104
3.6 Conclusiones .....	109
3.7 Referencias .....	110
Capítulo 4: Inmovilización de moléculas bioactivas sobre monocapas autoensambladas de alcanotioles .....	114
4.1 Introducción .....	116
4.2 Experimental .....	122

4.3 Flavina Adenina Dinucleótido (FAD)	126
4.4 Azul de metileno (MB)	135
4.5 Conclusiones	138
4.6 Referencias	139
Capítulo 5: Bicapas de fosfolípidos soportadas sobre monocapas autoensambladas de ditiotreitól	143
5.1 Introducción	145
5.2 Experimental	154
5.3 Fusión de vesículas de DMPC sobre SAMs de DTT	158
5.4 Interacción con MB y FAD	162
5.5 Interacción con ftalocianina de Zn	171
5.6 Conclusiones	177
5.7 Referencias	178
Capítulo 6: Bicapas híbridas de fosfolípidos sobre monocapas autoensambladas de dodecanotiol	182
6.1 Introducción	184
6.2 Experimental	189
6.3 Transferencia de monocapas de fosfolípidos sobre SAMs de dodecanotiol	192
6.4 Interacción con MB	196
6.5 Conclusiones	199
6.6 Referencias	200
Capítulo 7: Conclusiones generales	202
Apéndice: Publicaciones	205
Lista de ilustraciones de los capítulos	

# Resumen

La ciencia bioinspirada permite el desarrollo de sistemas modelo tanto para estudios fundamentales como para aplicaciones tecnológicas. En este trabajo de Tesis se estudian las interacciones entre monocapas autoensambladas de alcanotioles sobre sustratos ordenados y altamente desordenados de Au y moléculas bioactivas, biomoléculas y vesículas para el desarrollo de sistemas biomiméticos.

Este trabajo se organiza en 7 capítulos. El Capítulo 1 brinda una breve introducción de los conceptos clave empleados y los objetivos a seguir. El Capítulo 2 ofrece una descripción de las técnicas empleadas así como los detalles de operación. En los Capítulo 3-6 se presentan los resultados acerca del autoensamblado de alcanotioles y  $\alpha,\omega$ -alcanoditioles sobre oro (Cap. 3), la inmovilización de azul de metileno (MB) y Flavina-Adenina Dinucleótido (FAD) sobre monocapas autoensambladas de tioles (Cap. 4), la formación de bicapas de fosfolípidos sobre monocapas autoensambladas de ditiotreitól (DTT) (Cap. 5) y la formación de bicapas híbridas fosfolípido/tiol (Cap. 6). Finalmente, en el Capítulo 7 se presentan las conclusiones generales y en el Apéndice se adjuntan los trabajos publicados.

# Lista de símbolos y abreviaciones

HER	Reacción de evolución de hidrógeno
HOPG	Grafito pirolítico altamente orientado
SAMs	Monocapas autoensambladas
SCE	Electrodo de calomel saturado
UHV	Ultra alto vacío

## Moléculas

FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
MB	Azul de Metileno
ZnPc	Ftalocianina de Zn(II)
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
PT	1-Propanotiol
BT	1-Butanotiol
HT	1-Hexanotiol
NT	1-Nonanotiol
DT	1-Decanotiol
DDT	1-Dodecanotiol
HDT	1-Hexadecanotiol
ODT	1-Octadecanotiol
BdT	1,4-Butanoditiol
HdT	1,6-Hexanoditiol
NdT	1,9-Nonanoditiol
DTT	DL-Ditiotreitol

## Técnicas

CV	Voltamperometría cíclica
AFM	Microscopía de Fuerzas Atómicas
STM	Microscopía de Barrido por Efecto túnel
XPS	Espectroscopía de Fotoelectrones por Rayos X
SERS	Espectroscopía Raman amplificada por Superficies
LB	Langmuir-Blodgett
RAIRS	Espectroscopía Infrarroja de Reflexión-Absorción
SFG	Espectroscopía de Generación de Suma de Frecuencias
PM-IRRAS	Espectroscopía Infrarroja de Reflexión-Absorción por Modulación de la Polarización

## Variables

$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	frecuencia de vibración
$t_i$ [min]-[h]	tiempo de inmersión
$q$ [ $\mu\text{C cm}^{-2}$ ]	densidad de carga
$i$ [ $\mu\text{A}$ ]	corriente
$j$ [ $\mu\text{A cm}^{-2}$ ]	densidad de corriente
$E$ [V]	potencial
$\nu$ [ $\text{V s}^{-1}$ ]	velocidad de barrido
$V_T$ [V]	potencial túnel
$I_T$ [nA]	corriente túnel
$E_B$ [eV]	energía de unión
$A$ [ $\text{\AA}^2/\text{molec}$ ]	área por molécula
$\pi$ [mN/m]	presión superficial

# Capítulo 1

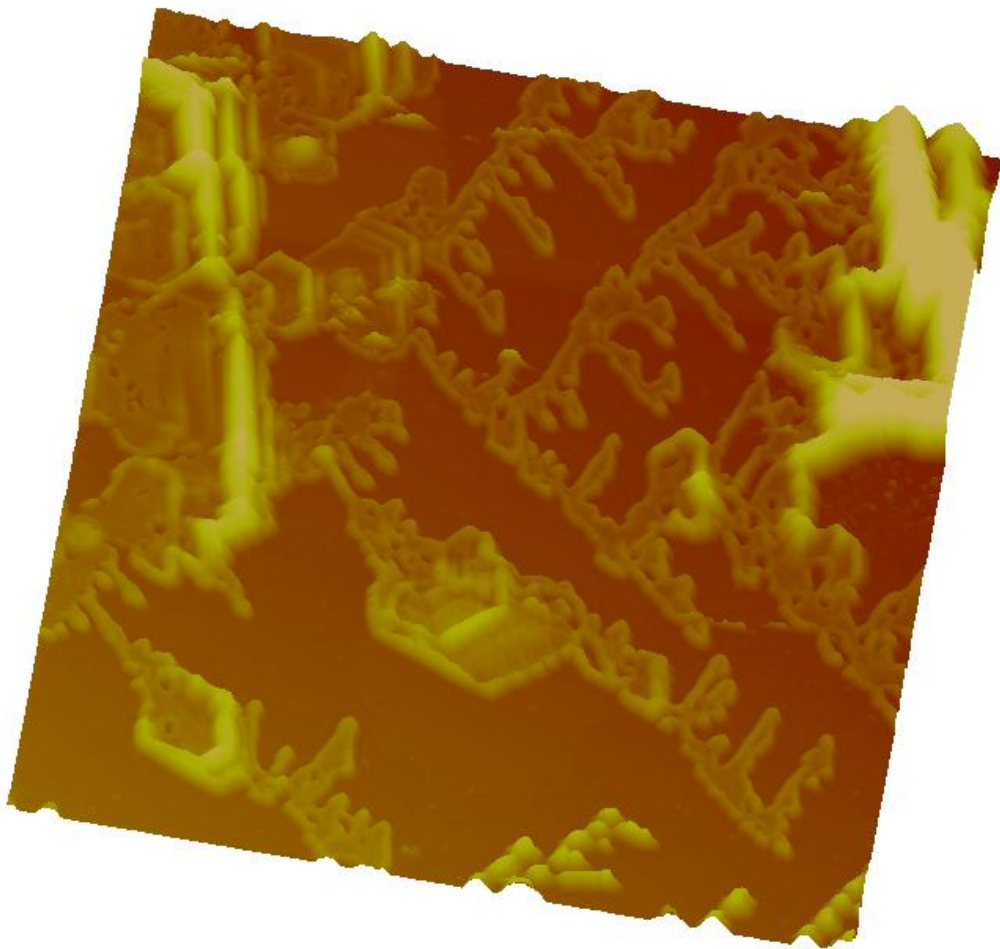
## Introducción general

Se comentan los conceptos clave sobre los cuales se fundamenta este trabajo de Tesis así como también se indican la motivación y los objetivos a seguir.

*"I would like to describe a field, in which little has been done, but in which an enormous amount can be done in principle."*

There's Plenty of Room at the bottom - Richard P. Feynman

("Quisiera describir un campo, en el cual se ha hecho poco, pero en el que en principio se puede hacer una enorme cantidad.")



*"Close to the edge"*

Yes (1972)



## 1.1 Nanociencia y nanotecnología

La ciencia y la tecnología de los objetos de la nanoescala (nanopartículas, capas finas y monomoleculares, fibras delgadas, etc.) fueron materia de estudio mucho tiempo antes de la instauración de los términos “nanociencia” y “nanotecnología”, que surgieron recién a mediados de la década del '70.<sup>[1]</sup> A modo de ejemplo, el desarrollo y manipulación de metales y aleaciones durante siglos involucró tratamientos mecánicos y de calor, generando propiedades especiales de resistencia debido a la formación de nanoestructuras.<sup>[2]</sup> Si bien antiguamente los artesanos metalúrgicos buscaban mejorar sus productos a base de prueba y error, ciertamente podían reproducir sus resultados, constituyendo una verdadera tecnología. Por otro lado, las primeras nociones de la ciencia en la nanoescala pueden relacionarse con los experimentos de Michael Faraday sobre las propiedades ópticas del oro coloidal, en los cuales relaciona los fenómenos observados con el tamaño del material.<sup>[3]</sup>

Hoy en día, el término *nanociencia* se utiliza para describir los campos interdisciplinarios de la ciencia que se dedican al estudio de fenómenos y estructuras que sólo aparecen a escala nanométrica. La diversidad de aplicaciones y la complejidad de los problemas abordados implican la participación de físicos, químicos, biólogos, bioquímicos, farmacéuticos y representantes de otras disciplinas. La nanociencia, entonces, consiste en el estudio de materiales y sistemas cuyas dimensiones se encuentran entre 1 y 100 nm en, al menos, una dirección. Las propiedades de los sistemas nanoscópicos están relacionadas con su composición y estructura particular. Por esta razón, la *nanotecnología* involucra el desarrollo y la fabricación de estos nuevos materiales y dispositivos para un gran rango de aplicaciones como la conversión de energía, el almacenamiento de información, el desarrollo de dispositivos electrónicos avanzados, la selección de drogas, y en sensores químico/biológicos.<sup>[4]</sup>

La primera mención de algunos de los conceptos característicos de la nanotecnología tuvo lugar en “*There’s plenty of room at the bottom*” (“Hay mucho lugar en el fondo”), una charla dada por el físico Richard Feynman en la American Physical Society en un encuentro en Caltech el 29 de diciembre de 1959. Feynman describió allí un proceso mediante el cual la habilidad de manipular átomos y moléculas individuales sería desarrollado, notando que al cambiar de escala variaría la magnitud de varios fenómenos físicos: la gravedad sería menos

importante, la tensión superficial y las fuerzas de Van der Waals serían más importantes, etc.<sup>[5]</sup> Las nanopartículas tienen capacidades muy diferentes a sus contrapartes macroscópicas. El oro, por ejemplo, que es químicamente inerte en escalas normales, puede ser un potente catalizador en la nanoescala.

Sin embargo, al plantear esta visionaria propuesta el principal interrogante era cómo lograr la manipulación, o bien, cómo controlar la organización de los átomos y moléculas en la preparación de nuevos materiales y dispositivos. En este sentido, la biología constituyó una fuente de inspiración: las células y sus componentes se construyen por autoorganización y autoensamblado de biomoléculas como fosfolípidos, proteínas, bases nitrogenadas, etc.<sup>[6]</sup> Es decir, se puede encontrar un vínculo entre los fenómenos estudiados en sistemas biológicos y los aprovechados en nanotecnología, ya que la célula, la unidad fundamental de la vida, es esencialmente, desde un punto de vista, una colección de sofisticadas nanomáquinas.<sup>[7]</sup>

A su vez, el desarrollo de las nuevas herramientas nanocientíficas ha tenido un enorme impacto en el conocimiento de la biología, la biotecnología y la medicina.<sup>[8]</sup> De la misma manera, la comprensión de la biología con la ayuda de la nanotecnología posibilitaría la producción de materiales biomiméticos con arquitectura a nanoescala. Siendo los nanomateriales y los materiales biológicos, como los anticuerpos y las proteínas, de dimensiones comparables, se facilita el uso de los primeros para aplicaciones en biología y medicina. Los nanomateriales y nanodispositivos están siendo desarrollados de modo tal que posean características de diseño controladas a nivel molecular y tengan el potencial de interactuar directamente con las células y las macromoléculas.

Las propiedades de los componentes de dimensiones nanométricas deben ser trasladadas a la dimensión de los dispositivos para su utilización. Uno de los pasos clave para ello es sintetizar las nanoestructuras con diseños de redes bidimensionales (2D), redes tridimensionales (3D) o estructuras jerárquicas más complejas; o bien ensamblar componentes preformados a nanoescala en estructuras utilizables. Como método de síntesis de sistemas nanoestructurados, el uso de interacciones no covalentes (fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, electrostáticas, fuerzas capilares e interacciones  $\pi$ - $\pi$ ) entre los componentes ofrece una ruta simple y eficiente. Así, el autoensamblado ha surgido como una de las estrategias más prometedoras para sintetizar una gran variedad de

nanoestructuras debido a que facilita uno de los pasos más difíciles en la nanofabricación, aquellos que involucran la modificación de estructura a nivel atómico, usando las técnicas de síntesis química que han sido altamente desarrolladas. Además, se pueden incorporar estructuras biológicas directamente como componentes del sistema y como las estructuras formadas son estables, tienden a estar libres de defectos y a autorrepararse.

## 1.2 Sistemas biomiméticos

El estudio y la comprensión de los procesos que ocurren en los seres vivos ha llamado la atención desde el punto de vista tecnológico debido a la especificidad y eficiencia con la que se llevan a cabo.<sup>[9, 10]</sup> De este modo, se busca diseñar sistemas en los cuales se imita un aspecto beneficioso de un proceso o sistema biológico. Así, el término “biomimética” fue sugerido por Otto Schmitt, fundador del campo de la ingeniería biomédica, para describir la transferencia de ideas desde la biología hacia la tecnología. Más tarde, Janine Benyus publicó *“Biomimicry: Innovation Inspired by Nature”* (“Biomimetismo: Innovación inspirada en la Naturaleza”) redefiniendo el término como “una nueva ciencia que estudia los modelos de la naturaleza y luego los imita o se inspira en estos diseños y procesos para resolver problemas humanos”.<sup>[11]</sup>

Las células están construidas a partir de macromoléculas y ensamblados supramoleculares. Tanto la arquitectura intracelular como las interacciones entre células están basadas en nanoestructuras, las cuales constituyen materiales altamente inteligentes.<sup>[12]</sup> Entre algunos de los aspectos clave presentes en los sistemas vivos, que surgen de su diseño, se encuentran la multifuncionalidad, la organización jerárquica, la adaptabilidad, la fiabilidad, la autorregulación y la autorreparación.<sup>[13]</sup> Estas características han sido logradas a través de los procesos evolutivos, los cuales tienen lugar a escala molecular.<sup>[13]</sup> Por lo tanto, el diseño de sistemas biomiméticos está relacionado tanto con la comprensión de los mecanismos que operan a esta escala como con la configuración de los bloques arquitectónicos empleados por la naturaleza. Así, las actividades de investigación en esta área son también de carácter interdisciplinario e involucran la combinación de físicos, químicos, biólogos moleculares y bioingenieros.<sup>[12]</sup>

Los campos en los que se aplican actualmente conceptos de biomimetismo son diversos e incluyen el desarrollo de nuevos materiales, el almacenamiento de información, la producción de energía, la medicina, la farmacología y los sistemas sensores/reporteros.<sup>[10, 12, 13]</sup> En particular, son de gran interés los procesos y sistemas asociados con las membranas celulares tales como la capacidad de barrera, transporte activo y pasivo, canales, receptores, motores moleculares, cadena transportadora de electrones y procesos de adhesión y fusión.<sup>[12]</sup> Debido a la estabilidad y a la capacidad de autorreparación de las bicapas lipídicas, se han construido distintos modelos de membranas biomiméticas, en las cuales se emplean componentes de origen biológico o sintético, y donde es posible tener un completo control del sistema.<sup>[12, 13]</sup>

Dentro de las ramas surgidas por bioinspiración, los biosensores constituyen uno de los ejemplos más exitosos, ya que combinan la selectividad del componente biológico con el poder de procesamiento de la microelectrónica moderna y la optoelectrónica. De esta manera, ofrecen una herramienta analítica con aplicaciones en medicina, medio ambiente y la industria de alimentos.

Los biosensores consisten en sistemas de bio-reconocimiento, típicamente enzimas o proteínas de unión, tales como los anticuerpos, los cuales se inmovilizan en la superficie de transductores fisicoquímicos.<sup>[14]</sup> Las interacciones específicas entre el analito y la capa de bio-reconocimiento producen un cambio fisicoquímico que es detectado y medido mediante el transductor.<sup>[14]</sup> Los transductores varían de acuerdo al parámetro elegido para las medidas, pudiendo ser electroquímicos (potenciométricos o amperométricos), ópticos, mecánicos o por cambios térmicos o de masa.<sup>[15]</sup>

Entre los ejemplos más difundidos en esta área se encuentra el biosensor amperométrico de glucosa, desarrollado por Leland C. Clark,<sup>[16]</sup> el cual permite medir en el acto la concentración sanguínea de glucosa mediante la extracción de una pequeña gota de sangre sin necesidad de purificación. El principio de reconocimiento en este caso es la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en una matriz polimérica en contacto con un electrodo de Pt.<sup>[17]</sup>

### 1.3 Objetivo de esta tesis

Este trabajo de Tesis se enfoca en la construcción de sistemas biomiméticos inspirados en las membranas biológicas mediante estrategias basadas en el empleo de monocapas autoensambladas de alcanotioles sobre oro. La caracterización de estos sistemas se realiza a través de un enfoque transdisciplinario, con el empleo de múltiples técnicas relacionadas con la fisicoquímica de superficies e interfaces (STM, AFM, XPS, SERS, técnicas electroquímicas y balanza de Langmuir-Blodgett) y la utilización de sondas moleculares (Azul de Metileno y Flavina-Adenina Dinucleótido).

La necesidad del desarrollo de este tipo de sistemas es evidente debido al gran número de áreas de investigación en los cuales se estudian procesos que tienen lugar en las membranas, siendo imprescindible la disponibilidad de sistemas biofísicos modelo. A su vez, estos sistemas, siendo estables y reproducibles, ofrecen una plataforma tecnológica con potenciales aplicaciones en detección electroquímica y óptica.

### 1.4 Referencias

1. Sandhu, A. (2006) Who invented nano?, *Nat Nano* 1, 87-87.
2. Reibold, M.; Paufler, P.; Levin, A. A.; Kochmann, W.; Patzke, N.; Meyer, D. C. (2006) Materials: Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre, *Nature* 444, 286-286.
3. Faraday, M. (1857) The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 147, 145-181.
4. Timp, G. (1999) *Nanotechnology*, Springer-Verlag, New York.
5. Feynman, R. (1960) There's plenty of room at the bottom, *Engineering & Science* 23.
6. Hamilton, T. D.; MacGillivray, L. R. (2004) Self-Assembly in Biochemistry, Taylor & Francis.
7. Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. (2002) Self-assembly at all scales, *Science* 295, 2418-2421.
8. Kumar, C. S. S. R.; Hormes, J.; Leuschner, C. (2005) *Nanofabrication Towards Biomedical Applications: Techniques, Tools, Applications, and Impact*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
9. Bender, C. J. (2009) Chemical Evolution and Biomimetic Chemistry, in *Chemical Evolution II: From the Origins of Life to Modern Society*, pp 313-331, American Chemical Society.
10. Yahya, H. (2007) *Biomimetics: Technology imitates Nature*, Global Publishing.
11. Benyus, J. M. (1997) Biomimicry: Innovation Inspired by Nature, William Morrow & Company, Inc., New York.
12. Lipowsky, R. (2001) Biomimetic Materials and Transport Systems, in *European White Book on Fundamental Research in Materials Science* (Rühle, M., Ed.), pp 78-82, Max-Planck-Institut für Metallforschung, Stuttgart.

13. Fisher, R. J. (2000) Biomimetic Systems, in *The Biomedical Engineering Handbook* (Bronzino, J. D., Ed.) 2nd ed., CRC Press LLC, Boca Raton.
14. Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G. S. (1987) *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford.
15. Buck, R. P. (2000) Bioanalytic Sensors, in *The Biomedical Engineering Handbook* (Bronzino, J. D., Ed.) 2nd ed., CRC Press LLC, Boca Raton.
16. Clark Jr., L. C. (1956) Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 2, 41-48.
17. Wilson, G. S.; Hu, Y. (2000) Enzyme-Based Biosensors for in Vivo Measurements, *Chemical Reviews* 100, 2693-2704.

# Capítulo 2

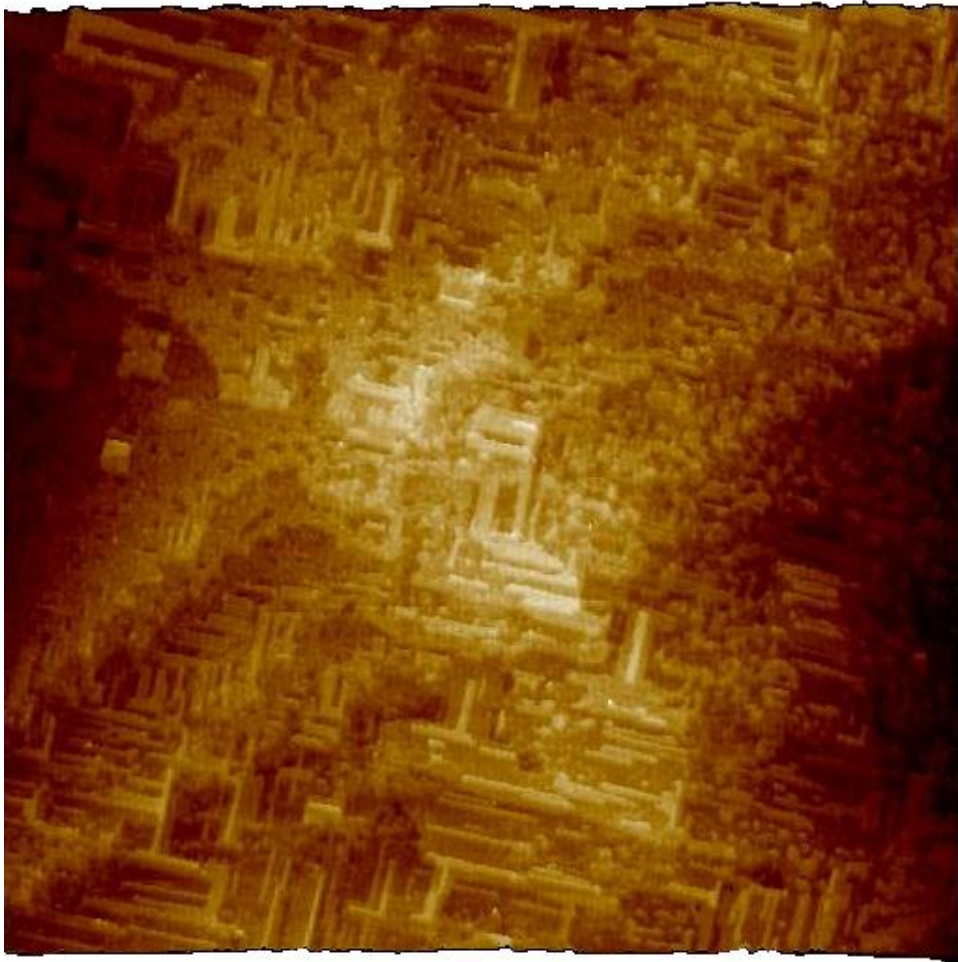
## Técnicas experimentales

Se describen los fundamentos de las técnicas empleadas así como los equipos y las condiciones de operación de cada uno de ellos.

*“Das Volumen des Festkörpers wurde von Gott geschaffen, seine Oberfläche aber wurde vom Teufel gemacht.”*

Wolfgang Pauli

(“El volumen de los sólidos fue hecho por Dios, pero su superficie es obra del Diablo.”)



*“Sympathy for the Devil”*

The Rolling Stones (1968)

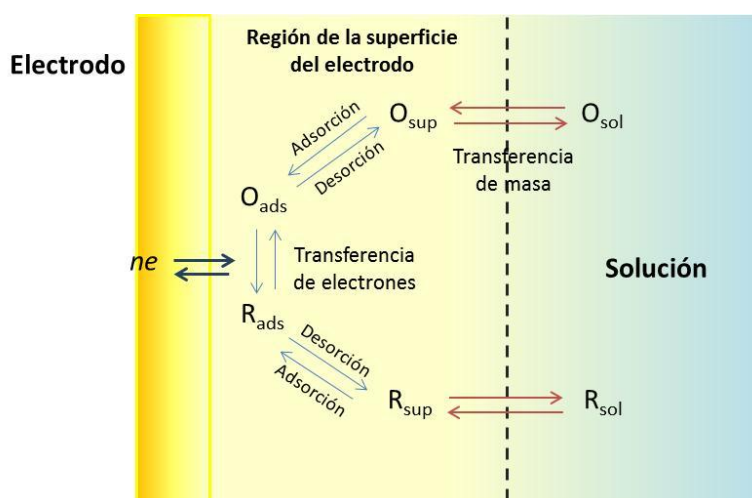


## 2.1 Métodos electroquímicos

### 2.1.1 Aspectos básicos

En los sistemas electroquímicos se estudian los procesos y factores que afectan el transporte de carga a través de la interfaz entre fases químicas, por ejemplo, entre un conductor electrónico (un *electrodo*) y un conductor iónico (un *electrolito*). La carga es transportada a través del electrodo por el movimiento de electrones (y huecos) mientras que en la fase del electrolito, la carga es llevada por el movimiento de los iones.

Dos tipos de procesos ocurren en los electrodos. Un tipo comprende reacciones en donde las cargas, por ejemplo electrones, son transferidas a través de la interfaz metal-solución (**Figura 2.1**). La transferencia de electrones causa la oxidación o la reducción. Como estas reacciones están gobernadas por la ley de Faraday (la cantidad de reacción química causada por el flujo de corriente es proporcional a la cantidad de electricidad circulada), se llaman procesos faradaicos. Bajo algunas condiciones, una interfaz electrodo/solución mostrará un rango de potenciales donde no ocurren procesos de transferencia de carga porque dichas reacciones no son favorables termodinámicamente o cinéticamente.

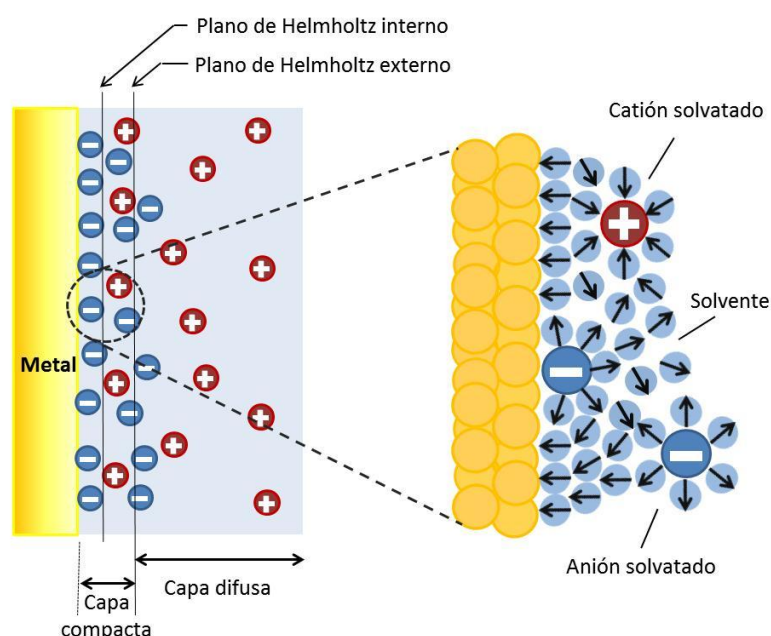


**Figura 2.1.** Esquema general de los fenómenos en la superficie de un electrodo.

Sin embargo, pueden ocurrir procesos como adsorción o desorción, y la estructura de la interfaz electrodo-solución puede cambiar con la variación del potencial o de la composición de la solución. Estos procesos se llaman no faradaicos. Aunque la carga no

cruce la interfaz, las corrientes externas pueden fluir (al menos transitoriamente) cuando el potencial, el área del electrodo o la composición de la solución cambian. Estos procesos dan origen a la denominada “corriente de doble capa”.

Las interfaces electrodo/electrolito exhiben una capacidad cuya magnitud refleja la distribución de iones en el lado de la solución de la interfaz. La doble capa de electrolito está compuesta por la capa de Helmholtz, una capa de iones y solvente en contacto físico con el electrodo, y la capa difusa, una capa de iones cercana al electrodo cuya concentración se desvía de la concentración en el seno de la solución (**Figura 2.2**).

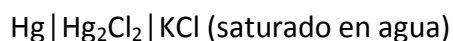


**Figura 2.2.** Modelo de la doble capa eléctrica en condición de adsorción específica de aniones.

Como no es posible experimentalmente tener una interfaz aislada, se estudian las propiedades de una colección de interfaces que se da a llamar *celda electroquímica*. Estos sistemas están definidos por al menos dos electrodos separados por una solución electrolítica. La diferencia de potencial entre los electrodos puede ser modificada por medio de una fuente de poder externa que produce una corriente que circula a través de las interfaces electrodo/solución en donde pueden ocurrir reacciones químicas.

La reacción química neta que ocurre en la celda está comprendida al menos por dos hemirreacciones independientes que describen los cambios químicos que ocurren en cada electrodo. La mayor parte del tiempo, uno está interesado sólo en una de estas

hemirreacciones y se denomina *electrodo de trabajo* (ET) al electrodo en donde ocurren. Para enfocarse en él, se estandariza la otra hemirreacción empleando un *electrodo de referencia* (ER) cuya composición de fases es esencialmente constante y su potencial de equilibrio no se modifica con el pasaje de corriente, es decir, es idealmente no polarizable. En este trabajo de Tesis se emplearon electrodos de calomel saturado (SCE) cuyos componentes son:



presentando un potencial de 0,242 V referido al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) al cual se le asigna arbitrariamente el valor 0 V. Como el electrodo de referencia tiene un potencial fijo y no circula corriente a través de este durante las medidas, cualquier cambio en el potencial aplicado a la celda modifica la polarización del electrodo de trabajo. Llevando el electrodo a potenciales más negativos, se aumenta la energía de los electrones en él, alcanzando así un nivel suficientemente alto para transferirse a estados electrónicos vacantes de especies en el electrolito. En ese caso, aparece un flujo de electrones desde el electrodo a la solución (*corriente de reducción*). De manera similar, la energía de los electrones en el metal (o semiconductor) puede ser disminuida imponiendo un potencial mayor; a cierto potencial aplicado los electrones de los solutos en el electrolito pueden ser transferidos hacia el electrodo, produciéndose procesos de *oxidación*. Los potenciales críticos en los cuales estos procesos ocurren están relacionados a los *potenciales standard*,  $E^\circ$ , para las sustancias químicas específicas en el sistema.

Para el diseño de la celda electroquímica se deben combinar diferentes elementos, tales como la cuba electrolítica, el material de los electrodos y los circuitos de corriente, con el fin de estudiar los cambios en el electrodo de trabajo de manera reproducible. Uno de los arreglos más empleados en los experimentos electroquímicos es la celda de tres electrodos (**Figura 2.3**). En esta configuración, la corriente pasa del electrodo de trabajo al electrodo auxiliar o *contraelectrodo* (CE), que se confecciona con un material, como por ejemplo Pt, que no produzca sustancias interferentes por electrólisis. El dispositivo que mide la diferencia de potencial entre ET y ER tiene una alta impedancia, por lo tanto, la cantidad de corriente que circula entre ellos es insignificante. Los tres electrodos se encuentran sumergidos en la solución electrolítica que completa el circuito.

Existen diversos métodos de medida por control de las distintas variables (potencial, corriente, impedancia, tiempo) dando origen a diferentes técnicas. Por ejemplo, se puede medir la corriente en función del tiempo o del potencial, manteniendo el potencial constante o variándolo de forma predeterminada con el tiempo. En este trabajo de Tesis se empleó la técnica de voltamperometría cíclica, cuya metodología describiremos a continuación.

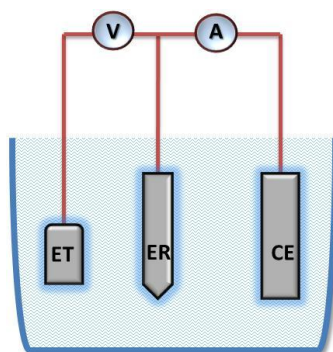


Figura 2.3. Arreglo de la celda de tres electrodos.

### 2.1.2 Voltamperometría cíclica

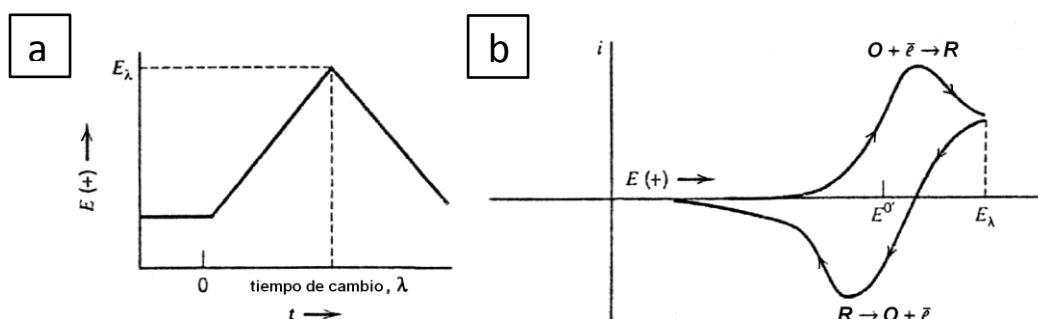
Esta técnica permite estudiar las propiedades redox de compuestos químicos y de estructuras de la interfaz. Es una herramienta importante para determinar los potenciales redox formales,<sup>a</sup> para la detección de reacciones químicas que preceden o siguen a una reacción electroquímica y para la evaluación de la cinética de transferencia de carga.

Cuando se grafica la corriente en función del potencial, se obtienen curvas ( $i$  vs.  $E$ ) que brindan información acerca de la naturaleza de la solución y los electrodos y acerca de las reacciones que ocurren en las interfaces. El número de electrones que cruza la interfaz está relacionado estequiométricamente con la reacción química y se mide en términos de la carga total,  $Q$ , que pasa por el circuito. La corriente,  $i$ , es la velocidad del flujo de la carga (o electrones).

En voltamperometría cíclica, el potencial aplicado se varía con el tiempo, a una velocidad ( $v = \Delta E/\Delta t$ ) determinada, mediante el uso de un *potenciostato*. Para las medidas que se llevaron a cabo en este trabajo se utilizaron variaciones lineales como las que se

<sup>a</sup> Aunque los potenciales normales son cantidades fundamentales para todos los cálculos termodinámicos, en la práctica suelen utilizarse los *potenciales formales*. Los potenciales formales difieren de los potenciales normales ya que los coeficientes de actividad,  $\gamma_i$ , se alejan de la unidad y debido a la presencia de reacciones paralelas, que modifican las concentraciones de las especies reactivas.

muestran en la **Figura 2.4a**, de modo tal que la curva de barrido es triangular: se comienza a un potencial dado, se llega a un potencial final y luego se retorna al mismo potencial inicial. Durante el barrido de potencial, el potenciostato mide la corriente resultante debida al potencial aplicado. Este instrumento modifica la diferencia de potencial entre el ET y el CE y, debido a ello, circula corriente entre estos electrodos. Simultáneamente, la diferencia de potencial entre el ET y el ER varía de acuerdo con el programa lineal que se haya establecido. En otras palabras, el potenciostato es un elemento activo que fuerza a través del electrodo de trabajo la corriente requerida para alcanzar el potencial deseado en un momento dado. Como la corriente y el potencial están relacionados funcionalmente, esa corriente es única.



**Figura 2.4.** a) Barrido cíclico de potencial. b) Voltamperograma cíclico resultante.

Si se grafica la corriente registrada en función del potencial aplicado, se obtiene un voltamperograma cíclico (**Fig. 2.4b**), que depende no sólo de un gran número de parámetros físicoquímicos sino, además, del tiempo. La **Figura 2.4b** ilustra la respuesta esperada para una cupla redox reversible durante un ciclo de barrido. Aquí se supone que sólo la forma oxidada O está presente inicialmente. De esta manera, se elige un potencial que barre hacia el sentido positivo para el primer medio ciclo, empezando desde un valor en el que no se produce la reacción. A medida que el potencial aplicado se aproxima al  $E^\circ$  característico del proceso redox, la corriente catódica comienza a aumentar, hasta que se alcanza un pico. Después de atravesar la región de potencial en donde tiene lugar el proceso de reducción, la dirección del barrido de potencial se revierte. Durante el barrido, las moléculas R (generadas en el primer medio ciclo, y acumuladas cerca de la superficie) son reoxidadas a O y aparece un pico anódico. Como resultado se obtiene información acerca del potencial redox, las velocidades de la reacción electroquímica de los compuestos y la concentración de especies

electroactivas. Además es posible distinguir entre los procesos relacionados con especies adsorbidas sobre el ET y los debidos a especies en solución, siendo posible analizar la reversibilidad o irreversibilidad de los procesos de transferencia electrónica, el número de electrones transferidos, los coeficientes de difusión y las constantes de velocidad, entre otros parámetros.

La densidad de carga eléctrica,  $q$ , registrada durante la oxidación o reducción es un parámetro cuantitativo valioso que puede extraerse de las curvas  $i$  vs  $E$ . A partir de la carga pueden obtenerse datos estructurales como la fracción de la superficie bloqueada en procesos de adsorción-desorción o el número de electrones intercambiados por sitio de adsorción. El cálculo de la carga implica la integración de la siguiente expresión:

$$q = \int_{t_1}^{t_2} j(t) dt \quad (2.1)$$

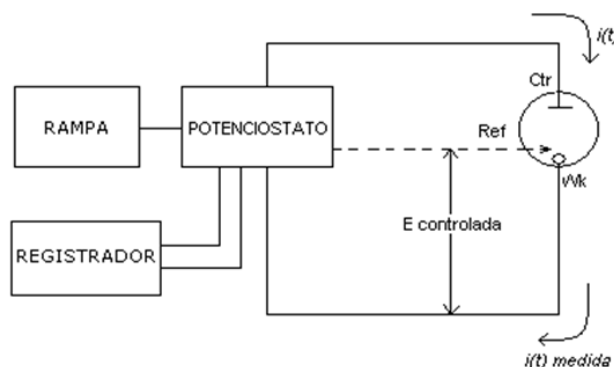
donde  $t$  es el tiempo y  $j$  la densidad de corriente (corriente expresada por unidad de área). Teniendo en cuenta la velocidad de barrido  $v$  ( $\Delta E/\Delta t$ ), podemos reescribir la ecuación 2.1:

$$q = \frac{1}{v} \int_{E_1}^{E_2} j(E) dE \quad (2.2)$$

De este modo a partir de la integración de las curvas  $j$  vs.  $E$  (voltamperogramas) entre dos potenciales seleccionados, a una  $v$  dada, se obtiene la densidad de carga expresada en coulombs por unidad de área (por ejemplo,  $\mu\text{C cm}^{-2}$ ).

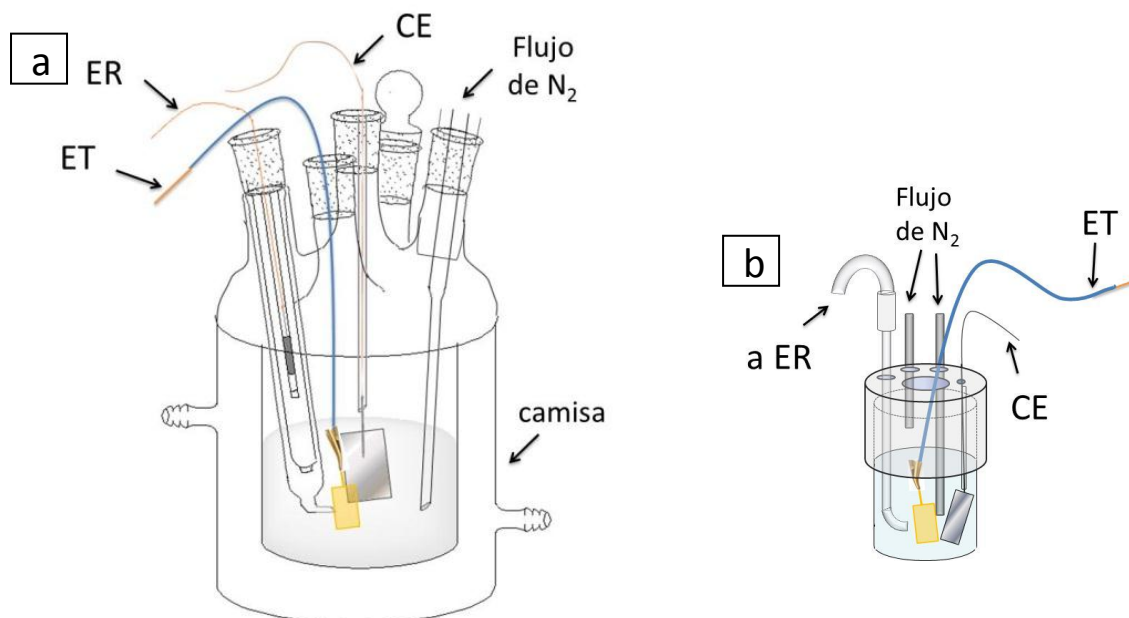
### 2.1.3 Arreglo experimental

Las medidas de voltamperometría cíclica se llevaron a cabo mediante el uso de un potenciostato con capacidad de registro digital de datos. Se emplearon distintos equipos de acuerdo a la disponibilidad en nuestro laboratorio (La Plata) o en los laboratorios donde se realizaron medidas complementarias (Florianópolis, Bariloche y Córdoba). Entre los equipos empleados se encuentran: PAR (Princeton Applied Research) modelo 273, Autolab PGSTAT100, Solartron 1287A, Zahner IM6d, TeQ-02 y  $\mu\text{AUTOLAB III}$ . El arreglo básico común a todos estos equipos se detalla en la **Figura 2.5**.



**Figura 2.5.** Arreglo experimental para medidas de voltamperometría cíclica.

Los experimentos se realizaron en celdas de vidrio de tres electrodos especialmente diseñadas (**Figura 2.6**). Las mismas poseen un burbujeador con una llave de tres vías, el cual permite purgar la solución y mantener una atmósfera saturada en  $N_2$ , ya que el  $O_2$  es una especie electroactiva que puede interferir en las medidas. Como contraelectrodos (CE) se emplearon láminas de Pt de gran área soldadas a un alambre de Pt. Los electrodos de referencia (ER) se construyeron en el laboratorio de acuerdo al formato de celda, tratándose de electrodos de calomel saturado (SCE) cuyo potencial se verificó periódicamente contra un SCE comercial.



**Figura 2.6.** Esquema de las celdas electroquímicas de vidrio empleadas a) volumen 50 mL y b) 5 mL. No se muestran los tapones de teflón y esmeriles que cubren cada salida.

Además se emplearon capilares de Luggin-Haber para disminuir la caída óhmica de potencial debido a la resistencia de la solución que puede perjudicar el flujo de corriente entre ER y ET. En general se emplearon las celdas de mayor volumen (**Figura 2.6a**), en las cuales se controló la temperatura por flujo de agua conectando la camisa a un baño termostático. En los casos en que fue necesario emplear poco volumen en la celda, se empleó otro diseño (**Figura 2.6b**), en el cual los electrodos están soportados sobre una tapa de teflón y el ER se encuentra localizado externamente al cuerpo de la celda. El control de temperatura en este caso se realizó mediante una cinta de calefacción conectada a una resistencia eléctrica.

Las soluciones electrolíticas empleadas y la preparación de los electrodos de trabajo se comentará en detalle en cada capítulo correspondiente.

## 2.2 Microscopías de barrido por sondas

Las microscopías por barrido de sondas (SPM, *scanning probe microscopy*) comprenden una gran familia de técnicas que permiten generar una imagen topográfica (3D) con resolución atómica de la superficie a través del control preciso de la posición de una punta delgada que interacciona con la superficie (**Figura 2.7**). A diferencia de las microscopías electrónicas desarrolladas con anterioridad, además de operar en ultra alto vacío (UHV) es posible realizar experimentos al aire o en líquidos, lo cual significó un gran avance para el estudio en nanoescala no sólo de sólidos sino también para sistemas biológicos.

El primer microscopio de esta línea fue diseñado en 1981 por investigadores de IBM Zürich. Este instrumento revolucionario funcionaba como un antiguo tocadiscos, en donde la punta se mueve hacia arriba y abajo y el cambio en impulso es registrado, enviado a amplificadores y convertido en señal. Debido a que este microscopio se basaba en el fenómeno mecánico cuántico de tunelamiento entre una punta metálica atómicamente aguda y una superficie conductora, se lo denominó microscopio de barrido por efecto túnel (STM, *scanning tunneling microscopy*). Tan sólo 5 años después, los inventores del STM, Gerd Binnig y Heinrich Rohrer, recibieron el premio Nobel de Física en 1986<sup>b</sup> junto a Ernst Ruska, quien fuera el encargado de desarrollar el primer microscopio electrónico

---

<sup>b</sup> "The Nobel Prize in Physics 1986". [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1986/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/)



convencional. Ese mismo año, Binnig, Quate y Gerber presentaron la microscopía de fuerzas atómicas (AFM, *atomic force microscopy*) basada en la detección mecánica de fuerzas débiles entre una punta y la superficie mediante el empleo de un soporte flexible (*cantilever*). Inmediatamente, el AFM se extendió hacia el mapeo de fuerzas de distintas clases, como magnéticas o electrostáticas, así como a la funcionalización de puntas para la detección química de especies en la superficie. Esta doble capacidad de detección de corrientes y fuerzas a nivel nanométrico y atómico llevó a un rápido crecimiento en variedades de técnicas SPM capaces de obtener información local de propiedades eléctricas, magnéticas, químicas, mecánicas, ópticas y térmicas en la nanoescala. Además ha sido demostrado que las técnicas SPM no sólo permiten la obtención de imágenes sino también el control y modificación de la estructura local y la funcionalidad del material. Debido a estas razones, las técnicas SPM han sido las responsables del gran desarrollo de la nanociencia y la nanotecnología en estas últimas décadas.

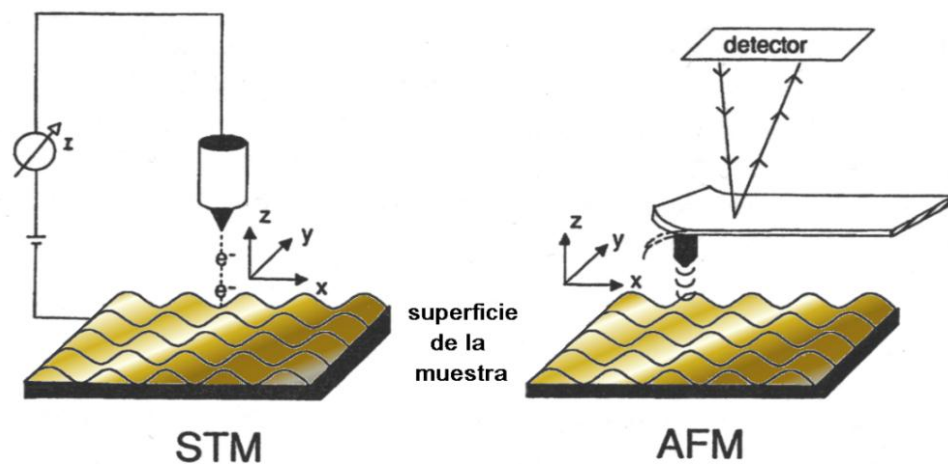


Figura 2.7. Esquema básico de STM y AFM

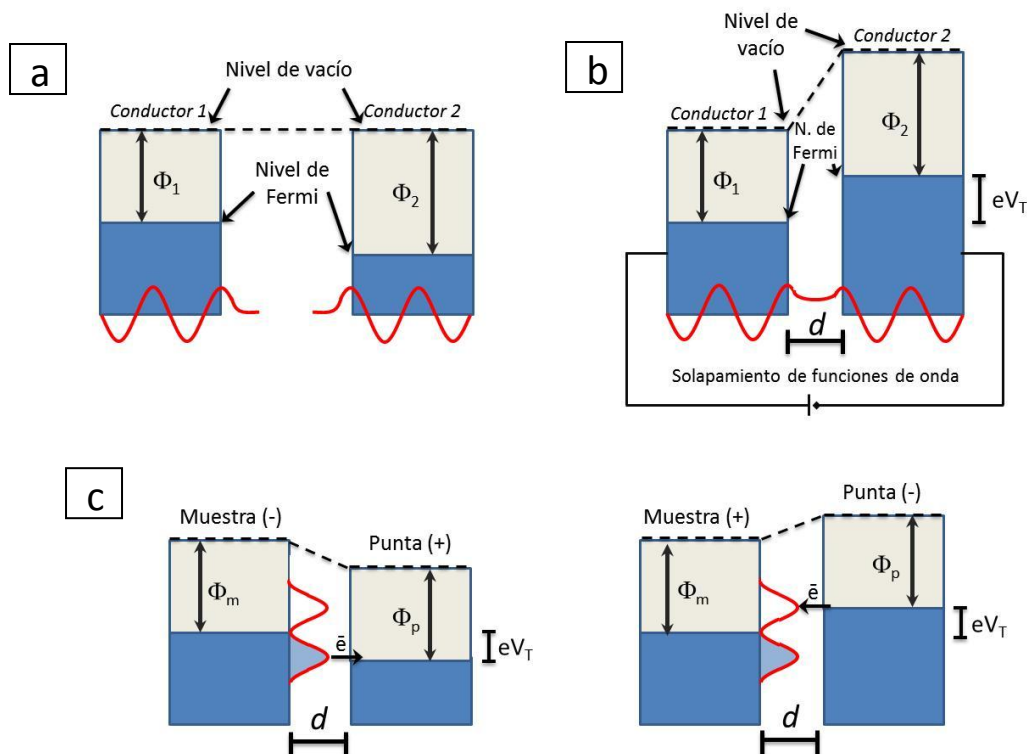
En este trabajo de Tesis se emplearon las técnicas de STM y AFM para la caracterización de superficies. Sus principios de operación y detalles experimentales se comentarán a continuación.

## 2.2.1 Microscopía de barrido por Efecto Túnel (STM)

### 2.2.1.1 El efecto túnel

El efecto túnel, en el que se basa el funcionamiento del microscopio, es un fenómeno nanoscópico que sólo se puede explicar a través de la mecánica cuántica. Si pensamos en los electrones como partículas, sería imposible que estos atravesaran una barrera de potencial mayor a su energía cinética, tal como estipula la física clásica. Sin embargo, los electrones también pueden ser descriptos como ondas y no están definidos por una posición precisa, sino por una nube de probabilidad. Por lo tanto, es posible que la nube se desplace de modo de superar la barrera de potencial permitiendo el pasaje del electrón entre dos zonas permitidas a través una zona “prohibida”, generando así una intensidad eléctrica.

Si se aproxima una punta metálica aguda a una superficie conductora o semiconductor, las cuales están separadas por un medio aislante (vacío, aire, etc.) a través del cual la conducción está clásicamente prohibida, a una distancia de unos pocos Ångstroms se produce un solapamiento importante de sus funciones de onda (**Figura 2.8 a-b**).



**Figura 2.8.** Esquema de dos conductores a) separados por una barrera de vacío y b) a una distancia  $d$  que permite el solapamiento de funciones de onda. c) Diagrama de energías (simplificado) del mecanismo túnel entre una punta metálica y una muestra aplicando distintos potenciales  $V_T$ .

Si aplicamos un potencial entre ambos conductores fluye una corriente túnel desde los estados electrónicos cercanos al nivel de Fermi<sup>c</sup> de un conductor hacia los estados desocupados del otro conductor. Esta corriente decae exponencialmente con la distancia de separación entre ambos conductores. Para un potencial pequeño entre punta y muestra en relación a la función trabajo,<sup>d</sup>

$$I_T \propto (V_T/d) e^{-\beta d\sqrt{\Phi}} \quad (2.3)$$

donde  $I_T$  representa la corriente túnel,  $d$  la separación punta/muestra,  $V_T$  el potencial aplicado entre los dos electrodos,  $\Phi$  representa la barrera local y, por último,  $\beta$  es una constante. Este decaimiento exponencial da origen a la gran resolución de la técnica: si  $d$  disminuye en 1 Å, para  $\Phi \approx 4$  eV la corriente túnel aumenta en un orden de magnitud.

Según el signo de potencial  $V_T$  aplicado, la corriente puede ir de la punta a la muestra o viceversa (**Figura 2.8 c**). Como la punta está comúnmente conectada a tierra, cuando  $V_T$  es positivo los electrones van desde los estados ocupados de la punta (con carga negativa) a los estados desocupados de la muestra (positiva). Equivalentemente, cuando  $V_T$  es negativo los electrones circulan desde los estados ocupados de la muestra (negativa) a los estados desocupados de la punta (positiva). Si ambos tipos de niveles tienen una naturaleza similar, como en el caso de dos conductores metálicos, el cambio en el signo de  $V_T$  no afecta la corriente túnel y, por lo tanto, las imágenes de STM obtenidas. En el caso de semiconductores o en presencia de adsorbatos, los niveles son distintos y las imágenes muestran mayor dependencia con la polaridad y magnitud de  $V_T$ .

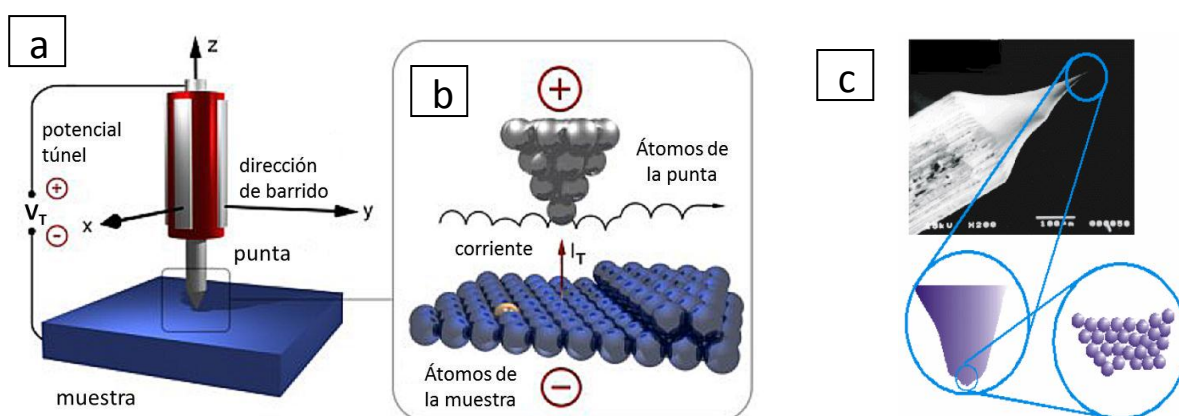
Idealmente se querría poder relacionar directamente la imagen de STM con las propiedades de la superficie. Sin embargo, los estados en el nivel de Fermi pueden tener una estructura espacial compleja. El tamaño, la forma y la naturaleza química de la punta no sólo influyen en la resolución alcanzada sino también en la estructura electrónica medida. Por lo tanto, la imagen obtenida será resultado de la densidad de estados de la muestra y la punta.

<sup>c</sup> nivel energético más alto ocupado por un sistema cuántico a temperatura cero (0 K).

<sup>d</sup> La función trabajo se refiere a una propiedad global de la superficie de un sólido que promedia sobre varias caras cristalinas en superficies policristalinas, la composición química de un sólido compuesto por varios elementos, la presencia de adsorbatos con cubrimiento no uniforme de la superficie, etc. La barrera local medida con el STM en cambio se refiere a una propiedad local de la superficie.

## 2.2.1.2 Componentes del STM

Las dos tecnologías esenciales que permiten la microscopía por efecto túnel son la formación de una punta metálica pequeña y el control fino de posición por parte de los piezoelementos (**Figura 2.9**). Las puntas se preparan a partir de alambres de tungsteno por métodos electroquímicos o bien por corte mecánico de alambres de Au, Pt, Pt/Ir o Rh/Ir. La sección de la punta que efectivamente participa en la microscopía está formada por los átomos cercanos a la superficie barrida (véase el detalle en la **Fig. 2.9c**).



**Figura 2.9.** Interacción entre la punta sostenida por el elemento piezoeléctrico a escala a) macroscópica y b) atómica. En c) se muestra el detalle de la punta desde la escala microscópica hasta la atómica.

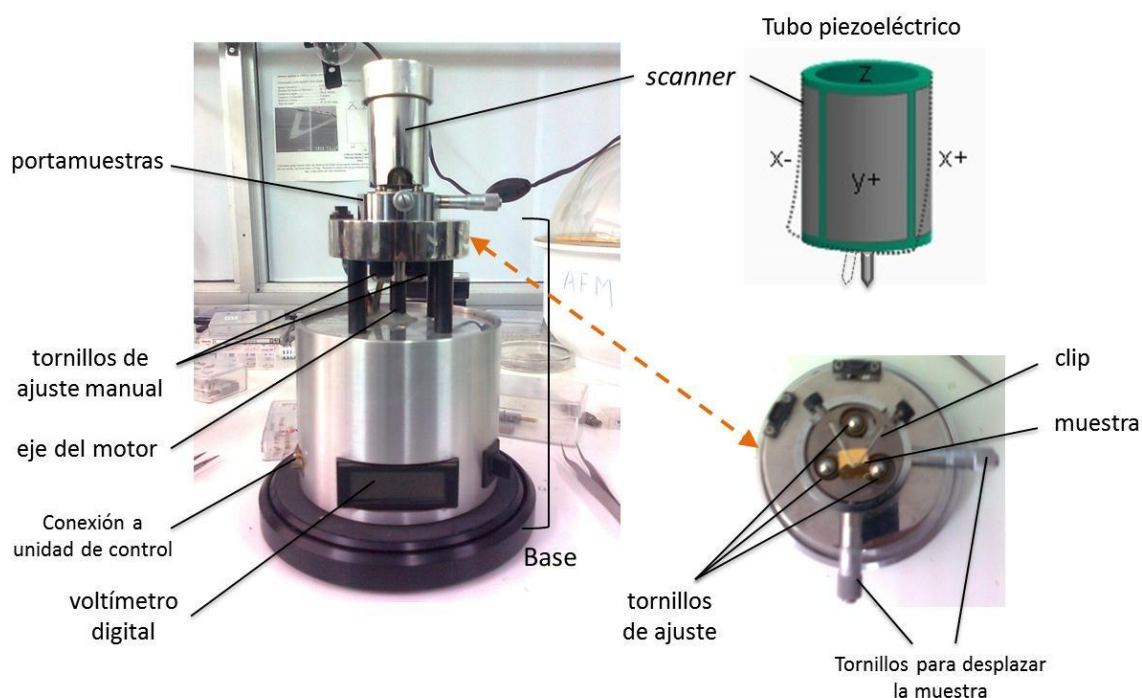
La punta se coloca sobre un soporte de acero inoxidable solidario al *scanner* (portapuntas), donde queda sujeta por un mecanismo a presión. Las posiciones vertical ( $z$ ) y lateral ( $x$ - $y$ ) de la punta relativas a la muestra están controladas por transductores piezoeléctricos,<sup>e</sup> los que se deforman por la aplicación de una diferencia de potencial regida por la unidad de control del microscopio. El *scanner* está constituido por un tubo hueco de material piezoeléctrico (en este caso  $(\text{Pb}, \text{Zr})\text{TiO}_3$ ) protegido por una cubierta de acero inoxidable (**Figura 2.10**). Los *scanners* se fabrican con diferentes coeficientes piezomecánicos

<sup>e</sup> El *efecto piezoeléctrico* fue descubierto en 1880 por los hermanos Pierre y Jacques Curie y se manifiesta debido a la perturbación del balance de carga de la red cristalina del material. Cuando las cargas negativas y positivas están igualmente distribuidas, el material no se deforma. Al aplicar una diferencia de potencial, se genera un desbalance en la carga que cambia ligeramente la red cristalina produciendo el estrés mecánico. El efecto converso también ocurre, al aplicar un estrés al material se crea una diferencia de potencial.

para barridos a escala atómica (0,15 - 0,20 nm/V) o en campos grandes (200 - 300 nm/V), los cuales limitan el tamaño máximo de imagen obtenida.

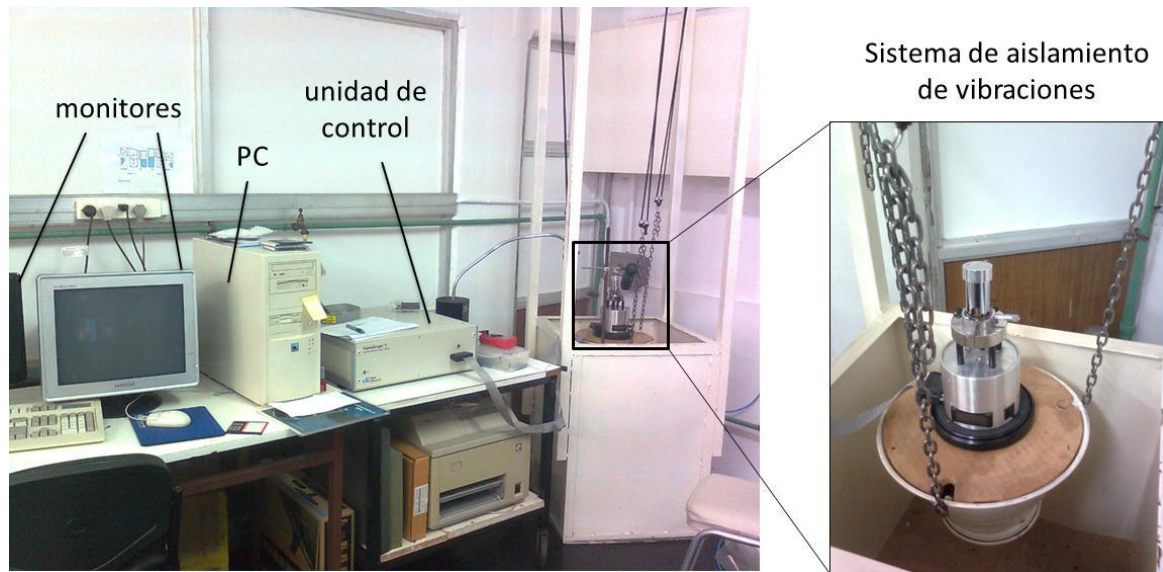
Para aproximar la punta a la muestra a una distancia tal que se produzca el efecto túnel, el STM posee un sistema constituido por 3 tornillos micrométricos sobre los cuales se soporta el *scanner*. Los dos tornillos delanteros son manuales mientras que el tercer tornillo, que se encuentra recubierto, se manipula mediante un motor (**Fig. 2.10**).

La base del microscopio se conecta a la unidad de control, la cual se dirige mediante una PC que posee un *software* propio del equipo. La muestra se coloca sobre el portamuestras donde se ajusta firmemente con un *clip* que permite el contacto eléctrico (**Fig. 2.10**). También es posible colocar en este sitio una pequeña celda para realizar medidas *in situ*.



**Figura 2.10.** Vista lateral del STM modelo Nanoscope IIIa de Digital Instruments Inc. Se muestra un esquema del tubo piezoeléctrico del *scanner* y una vista superior del portamuestras.

Debido a la alta sensibilidad, estos microscopios se deben aislar de las vibraciones ya sean propias del edificio o de ruidos provenientes del laboratorio. Para ello, se los coloca en un soporte resistente y pesado suspendido con cuerdas elásticas (**Figura 2.11**). Además, el equipo posee filtros para eliminar vibraciones de alta frecuencia.



**Figura 2.11.** Vista de los componentes del STM y el sistema de aislamiento de vibraciones.

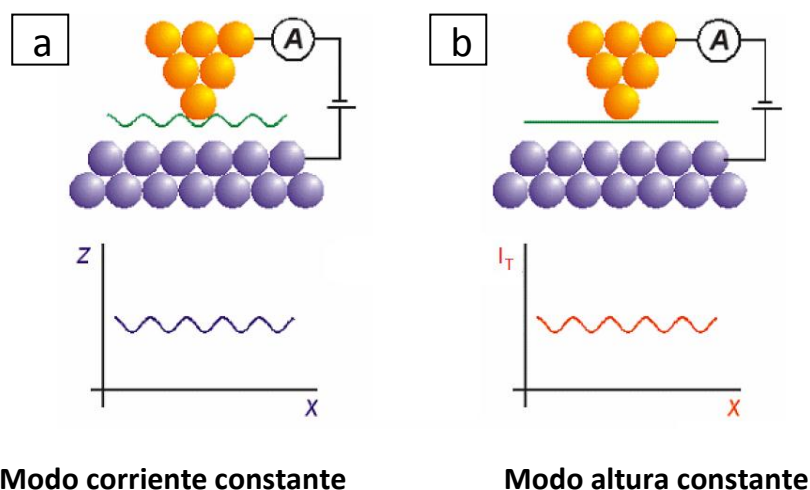
### 2.2.1.3 Operación del STM

En la operación del STM, las dos variables más influyentes son el potencial ( $V_T$ ) y la corriente ( $I_T$ ) túnel, las cuales se ajustan según los estados y niveles electrónicos de la muestra. Los valores de  $V_T$  típicamente varían entre 0,001 y 5 V mientras que los valores de  $I_T$  se fijan entre 0,05 y 40 nA. El empleo de corrientes del orden de los pA permite el estudio de muestras que sean poco conductoras.

El STM puede ser operado de diferentes modos, de los cuales el más comúnmente empleado es el modo de corriente constante (**Figura 2.12a**). En esta modalidad, mientras la punta barre la superficie, un sistema de retroalimentación modifica la elongación del piezoeléctrico, a través de la señal eléctrica aplicada, manteniendo la corriente túnel constante. La imagen topográfica, la cual es una representación tridimensional de una matriz de datos  $z(x,y)$ , se obtiene a partir del potencial que debe ser aplicado al piezoeléctrico en los puntos de la superficie con coordenadas  $(x,y)$ . En el modo de corriente constante se pueden barrer superficies de elevada rugosidad, esto es, que no son necesariamente planas a nivel atómico. Una desventaja de este modo es la respuesta finita del sistema de retroalimentación, lo que limita la velocidad de barrido. A bajas velocidades de barrido son evidentes algunas distorsiones de la imagen causadas por la deriva térmica (debido a la diferencia de temperatura entre la punta y la muestra) o bien por la histéresis del material



piezoeléctrico (sólo un 95% del material responde inmediatamente a la aplicación del potencial, el 5% restante tarda algunos minutos).



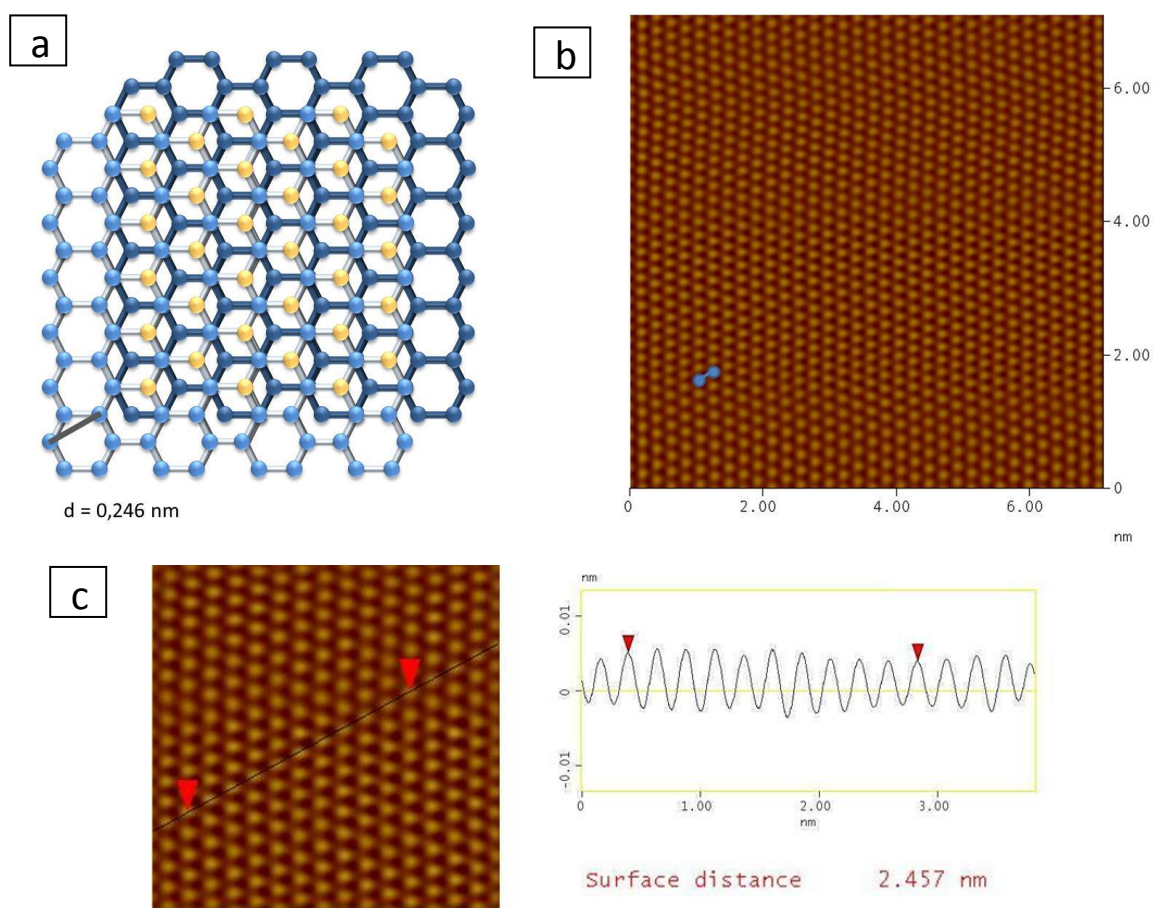
**Figura 2.12.** Modos de operación del STM a) corriente constante y b) altura constante.

Para aumentar la velocidad de barrido, se utiliza otro modo de operación. En el modo de altura constante (**Fig. 2.12b**), la punta barre la superficie de la muestra rápidamente a altura constante, sin emplear el sistema de retroalimentación. Las rápidas variaciones en la corriente túnel, que son registradas en función de la posición, permiten obtener resolución atómica. Este modo se puede aplicar sólo a aquellas superficies que sean atómicamente planas, de otra manera la punta se podría estrellar en alguna saliente mientras se barre a alta velocidad. Otro inconveniente en este modo radica en que, al desconocerse el valor de la barrera local  $\Phi$ , no es sencillo hallar una relación numérica exacta entre  $I_T$  y la distancia, resultando difícil obtener información topográfica de la muestra.

#### 2.2.1.4 Calibración del STM

Antes de comenzar a medir en el STM es necesario calibrar los piezoeléctricos tanto para el desplazamiento horizontal como para el vertical. Para la calibración en x-y, se emplea un patrón de grafito (HOPG, *highly oriented pyrolytic graphite*), que consiste en láminas apiladas de átomos de carbono en empaquetamiento compacto hexagonal, del cual se conocen sus distancias características (**Figura 2.13a**). Para realizar la calibración se emplea un HOPG recién exfoliado con el fin de contar con una superficie limpia. La exfoliación se

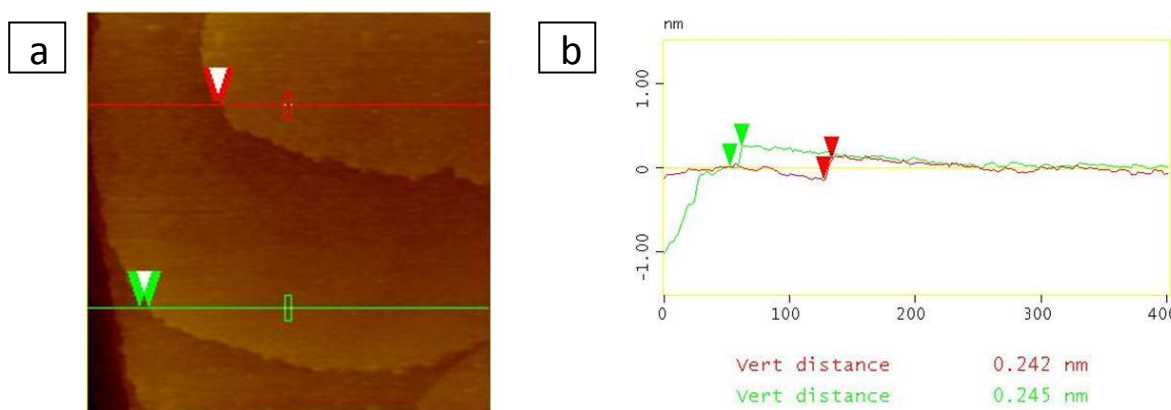
lleva a cabo generalmente aplicando una o varias veces cinta adhesiva sobre la superficie y despegándola, hasta lograr retirar las capas superficiales de forma pareja, es decir, sin que queden escamas. Luego, se toman imágenes a alta velocidad (10 - 20 Hz) para evitar deformaciones por deriva térmica (**Fig. 2.13b**). Para obtener las distancias características es necesario hacer un promedio de una serie de medidas, con tal fin se trazan líneas rectas a lo largo de 10 puntos brillantes (**Fig. 2.13c**). En un principio, se asignaron estos puntos brillantes a los átomos de C superficiales que se encuentran justo encima de los átomos de la capa inferior, luego se demostró por cálculos teóricos que éstos en realidad correspondían a los átomos situados por encima del centro de los anillos de la capa inferior (**Fig. 2.13a**).



**Figura 2.13.** Calibración x-y del STM con un patrón de HOPG. a) Esquema de las láminas de grafito, en amarillo se muestran los átomos que se observan por STM y la distancia característica entre ellos. b) Imagen de STM ex situ de HOPG de 7 nm x 7 nm tomada a 20 Hz, en la cual se puede observar el arreglo de átomos empleado en la calibración. c) Sección transversal donde se muestra una distancia de 2,457 nm entre 10 puntos brillantes.



Para la calibración en el eje z no es posible emplear el HOPG ya que se trata de un material deformable en esta dirección. Para ello, se utilizan los escalones monoatómicos del Au (111) (**Figura 2.14a**), cuya distancia característica es de 0,243 nm. Se debe realizar un promedio de las distancias verticales a partir de la sección transversal sobre distintos escalones para obtener un valor confiable (**Fig. 2.14b**).



**Figura 2.14.** Calibración en z del STM con Au(111). a) Imagen de STM ex situ de 400 nm x 400 nm de Au(111) evaporado sobre vidrio, en la cual se pueden observar terrazas separadas por escalones. b) Sección transversal de dos trazas horizontales sobre la imagen mostrada en a) y distancias en vertical de los escalones.

#### 2.2.1.5 Arreglo experimental

Se empleó un microscopio Nanoscope IIIa de Digital Instruments Inc. (Santa Barbara, California) en el modo corriente constante. En general se utilizó el *scanner D*, que permite barrer en campos de hasta 12  $\mu\text{m}$ , para medidas de las muestras en campos grandes y el *scanner A*, cuyo tamaño máximo de campo es de 929 nm, para medidas de resolución atómica y molecular. En todos los casos se emplearon puntas de Pt/Ir también de Digital Instruments, recién cortadas o bien se aseguró su limpieza enfrentándolas a una corriente de  $\text{N}_2$ .

Las muestras analizadas mediante esta técnica consistieron en sustratos de oro modificados y las condiciones de medida (potencial y corriente túnel) empleadas se comentarán en cada capítulo. Todas las imágenes se tomaron ex situ y se analizaron y procesaron mediante el programa proporcionado por los fabricantes del microscopio (versión 5.30).

### 2.2.2 Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM)

Si se monta una punta fina en un *cantilever*, posicionado mediante un elemento piezoeléctrico, se pueden medir las fuerzas superficiales en un rango de  $10^{-13}$  a  $10^{-6}$  N. El AFM mide las deflexiones en el cantilever debido a las fuerzas capilares, electrostáticas, de Van der Waals y friccionales entre la punta y la superficie. La ventaja de esta microscopía respecto del STM es que no está restringida a superficies conductoras, por lo que se pueden hacer medidas en todo tipo de superficies, independientemente de su naturaleza, ya sean de origen inorgánico, orgánico o biológico.

Esta microscopía supuso un gran avance en especial para la observación de muestras de origen biológico, ya que se pueden estudiar estructuras en un entorno semejante al que se encuentran naturalmente (medio acuoso), en lugar de sufrir un proceso de metalización como se procede en las microscopías electrónicas.

Además de su gran poder para la obtención de información topográfica, el AFM es una herramienta muy versátil que hoy en día goza de una enorme ramificación en distintas técnicas derivadas. Entre ellas cabe destacar la nanolitografía, la espectroscopía de fuerzas, la microscopía de fuerzas de fricción (FFM) y la microscopía de fuerzas magnéticas (MFM).

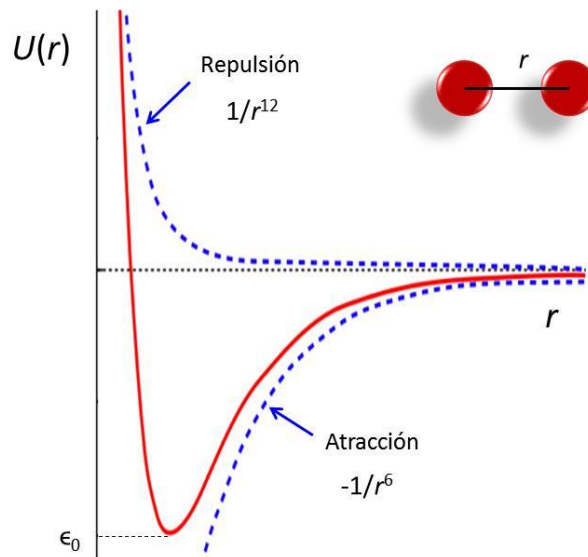
#### 2.2.2.1 La fuerza entre la punta y la muestra

Para el estudio de fuerzas intermoleculares, muchos sistemas físicos pueden ser aproximados con un modelo de interacción de energías potenciales. Uno de los modelos más exitosos y difundidos es el propuesto por Lennard-Jones, el cual propone que la energía potencial entre un par de átomos se rige por la expresión:

$$U(r) = 4\epsilon_0 \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2.4)$$

donde  $r$  es la separación entre átomos,  $\epsilon_0$  es la energía potencial en el mínimo y  $\sigma$  es el diámetro molecular efectivo. A largas distancias, el potencial está dominado por las interacciones atractivas mientras que a distancias cortas, las interacciones son fuertemente repulsivas, aumentando exponencialmente al disminuir  $r$  después de pasar por 0 donde  $r = \sigma$  (Figura 2.15).

El término  $(\sigma/r)^{12}$  modela la repulsión entre átomos cuando se los aproxima uno al otro a distancias muy cercanas. Esto puede explicarse según el principio de exclusión de Pauli, ya que cuando las nubes electrónicas comienzan a solaparse, la energía del sistema aumenta abruptamente. El exponente 12 se eligió por cuestiones de practicidad ya que de este modo la ecuación (2.4) es sencilla de calcular. En realidad, este comportamiento sería mejor modelado por un término exponencial.



**Figura 2.15.** Función del potencial de Lennard-Jones, indicando las contribuciones atractivas y repulsivas.

El término  $(\sigma/r)^6$  constituye la parte atractiva, dominando a largas distancias. Este término es el que proporciona cohesión al sistema y se origina en las fuerzas de dispersión de van der Waals. Estas interacciones son débiles y se deben a dipolos fluctuantes. Por lo tanto, el potencial de Lennard-Jones puede modelar con bastante precisión el comportamiento para gases nobles como Ar o Kr, donde éstas son las únicas fuerzas intermoleculares que operan.

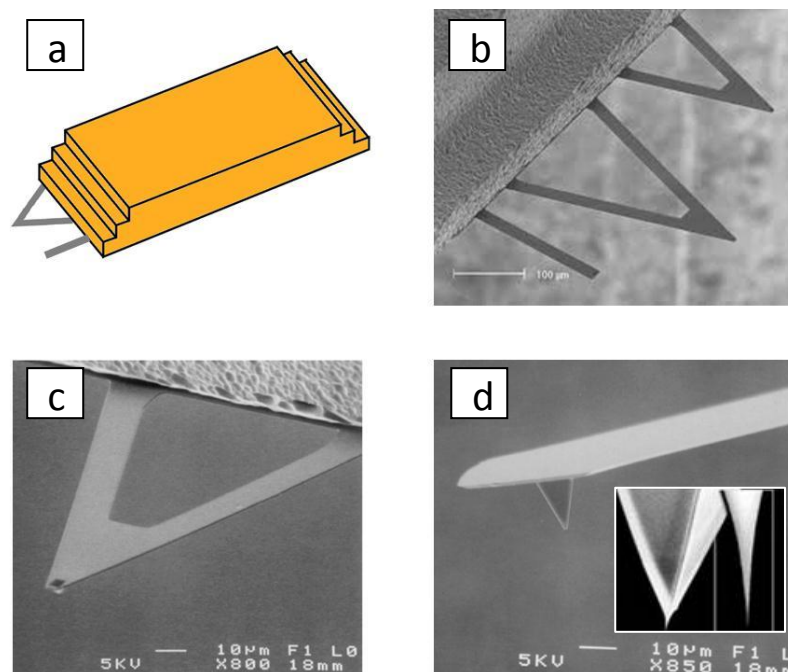
La expresión 2.4 puede reformularse si en lugar de dos esferas rígidas se tiene en cuenta la interacción entre dos superficies planas rígidas o bien una esfera rígida y una superficie plana elástica, brindando modelos de interacción más aproximados a los sistemas que se miden realmente mediante AFM.

Debido a que el AFM se basa en las fuerzas que actúan entre una punta aguda y la muestra, conocer estas fuerzas es sumamente importante para obtener una imagen apropiada. La fuerza no se mide directamente, sino que es calculada midiendo el movimiento de un soporte sobre el cual se encuentra la punta, llamado *cantilever*. Si se conoce la dureza del cantilever, se puede calcular la fuerza a través de la ley de Hooke:

$$F = -kx \quad (2.5)$$

donde  $k$  es la constante de fuerza del cantilever y  $x$  es la distancia desplazada.

Si bien se han diseñado distintos sensores para medir el movimiento del cantilever, hoy en día los microscopios emplean métodos ópticos. Los cantilevers, poseen una superficie reflectiva y se fabrican mediante tecnología MEMS (sistemas micro-electro-mecánicos). Pueden tener forma rectangular o triangular y están soportados sobre una oblea, de típicamente 3,5 mm x 1,6 mm y 0,5 mm de espesor (**Figura 2.16a-b**). La punta se encuentra en el extremo del cantilever, mirando hacia abajo (**Fig. 2.16c-d**). Las puntas poseen un radio de curvatura característico, el cual se elige dependiendo de la muestra y la aplicación, ya que la calidad de las imágenes dependerá de la geometría de la punta.

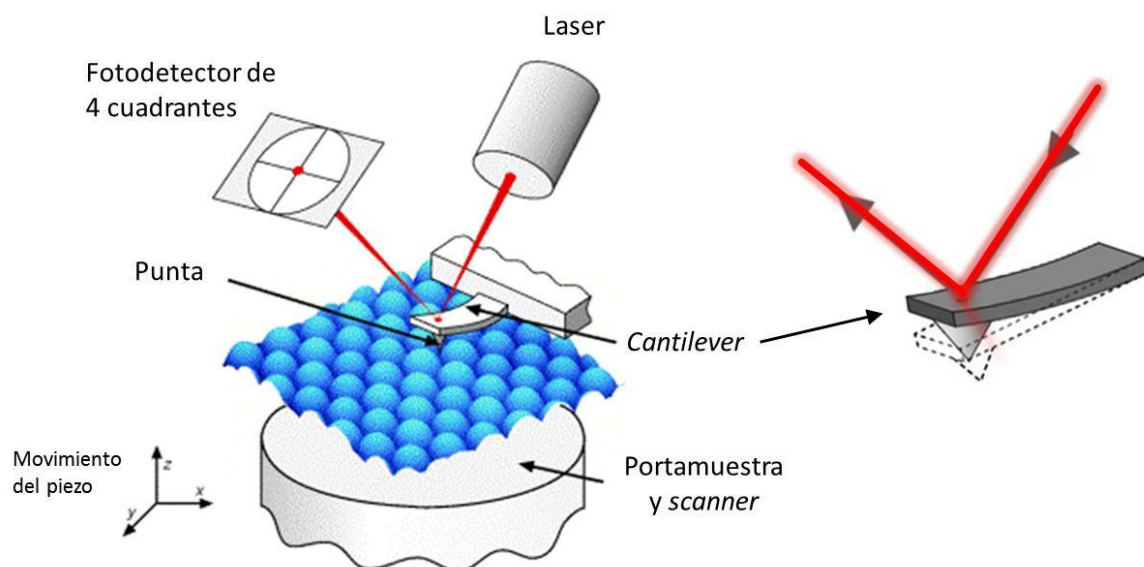


**Figura 2.16.** a) Esquema de la oblea que soporta los cantilevers. Imágenes de SEM extraídas de los manuales de Digital Instruments Inc. de: b) diferentes tipos de cantilever, c) un cantilever triangular y la punta que asoma por debajo y d) una punta de  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , en el recuadro se muestra un punta de diseño extra-agudo.

Los materiales más empleados en la fabricación de cantilevers son Si o  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Para aplicaciones específicas en las que se requiere la modificación posterior de la punta o bien para medidas magnéticas o conductivas, se pueden adquirir puntas de Au, Pt/Ir o diamante. La constante de fuerza de cada cantilever resultará no sólo de la naturaleza del material empleado sino de la geometría. El comerciante informa una constante nominal para cada cantilever, no obstante es necesario verificar su valor en cada caso particular, debido a que éste puede variar significativamente del valor informado.

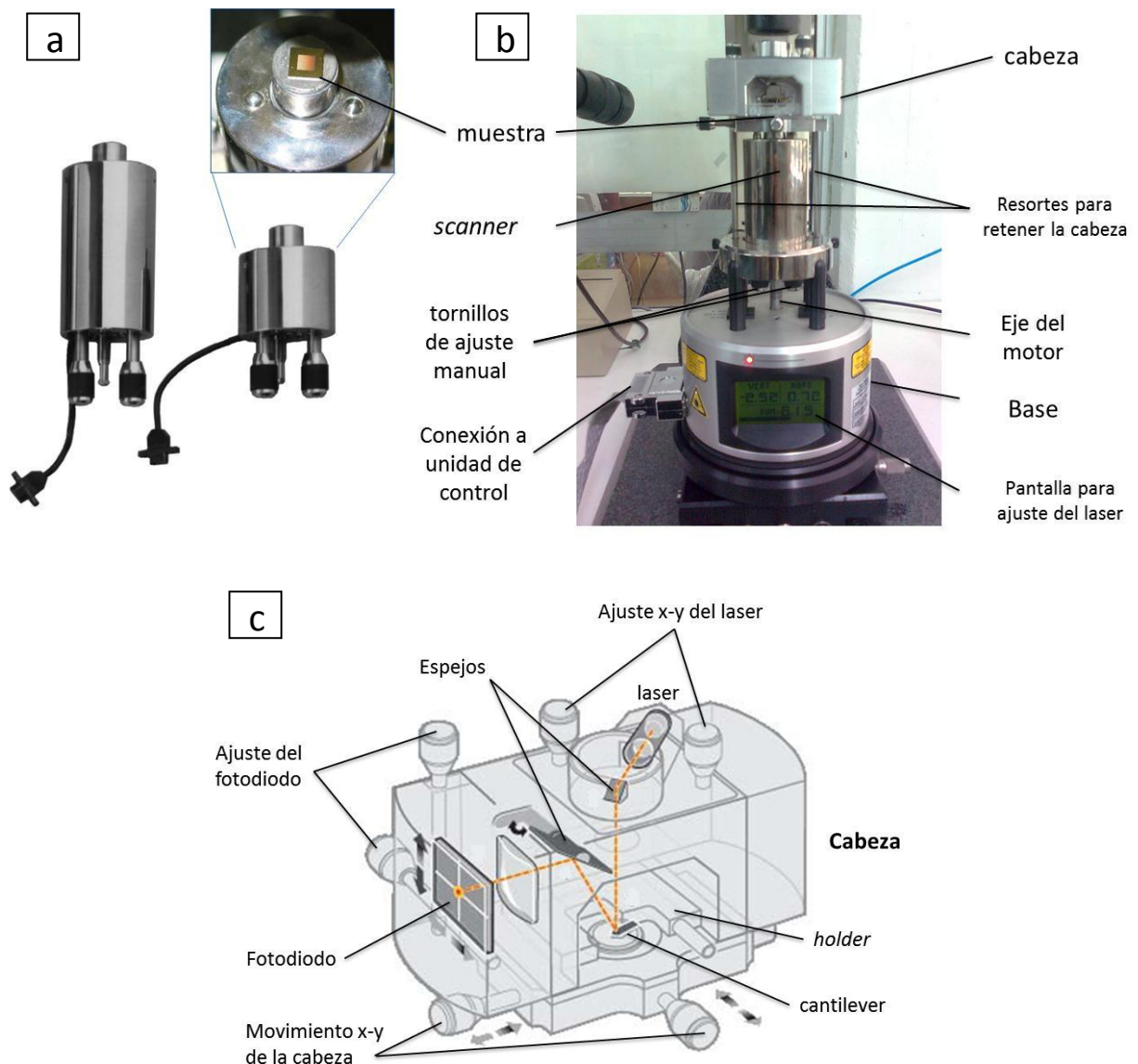
### 2.2.2.2 Componentes del AFM

Las tres piezas básicas que componen el AFM son los transductores piezoeléctricos (*scanners*), los transductores de fuerza y el control de retroalimentación. Básicamente, el *scanner* mueve la punta respecto de la superficie o viceversa mientras que el transductor de fuerza sensa el cambio de fuerza entre la punta y la muestra y el control de retroalimentación reenvía la señal al piezoeléctrico para mantener la fuerza fija entre la punta y la muestra. Casi todos los AFMs utilizan un sistema de deflexión de rayo laser, donde el laser es reflejado desde el cantilever reflectivo hacia un fotodetector sensible a la posición (**Figura 2.17**). El camino óptico entre el cantilever y el fotodetector produce una amplificación mecánica de la señal del laser y, como consecuencia, el sistema llega a detectar los movimientos verticales de la punta con una precisión inferior a un Ångstrom.



**Figura 2.17.** Sistema de lectura y detección del AFM por deflexión de un rayo laser.

Dependiendo del diseño del equipo, el *scanner* puede estar solidario ya sea a la punta (PicoScan) o a la muestra (Nanoscope V). A continuación se realizará la descripción del equipo para el modelo Nanoscope V de Digital Instruments Inc., siendo el otro equipo equivalente en operación. En este modelo, la muestra se soporta con cinta bifaz sobre un disco magnético que se une a la parte superior del *scanner* (**Figura 2.18a**). El *scanner* se ubica sobre la base del equipo que posee la conexión hacia la unidad de control (**Fig. 2.18b**), la cual se dirige mediante una PC que posee un software propio del equipo.



**Figura 2.18.** a) *Scanners* empleados en medidas de AFM y vista superior donde se observa la muestra sobre un portamuestra magnético unido a la parte superior del scanner. b) Vista lateral del Nanoscope V de Digital Instruments Inc. mostrando los componentes de este microscopio. c) Esquema de los componentes de la cabeza del microscopio, donde se detalla el camino del laser desde la fuente hasta el fotodiodo.



Como se describió para el STM, la punta se aproxima a la muestra mediante un sistema de tres tornillos, dos manuales y un tercero controlado por un motor.

La pequeña oblea que soporta el cantilever se debe sujetar firmemente mediante un clip al porta-cantilever o *holder*, que puede ser abierto, como el que se muestra en la **Figura 2.18c**, para medidas al aire. Si se desean hacer medidas en inmersión, se reemplaza este *holder* por una celda de líquidos, que posee el mismo sistema para sujetar la oblea.

El laser y el sistema de detección se encuentran en la cabeza (**Fig. 2.18c**), que está sujeta por resortes sobre el *scanner*. La señal del laser se debe maximizar sobre el extremo del cantilever, justo por encima de donde se encuentra la punta. Para ello se cuenta con un par de tornillos que permiten desplazar la posición del laser y otro par que permite hacer un ajuste más fino, acomodando la posición del fotodetector. Antes de llegar al fotodetector, el laser pasa por un espejo, el cual se debe acomodar de acuerdo al índice de refracción del medio en el que se realizan las medidas, es decir, si se trata de aire o líquido. La alineación del laser sobre el cantilever se lleva a cabo con la ayuda de lupas o bien con una cámara conectada a un monitor. En la **Figura 2.19** se pueden apreciar los dos sistemas de alineación montados en dos microscopios distintos.

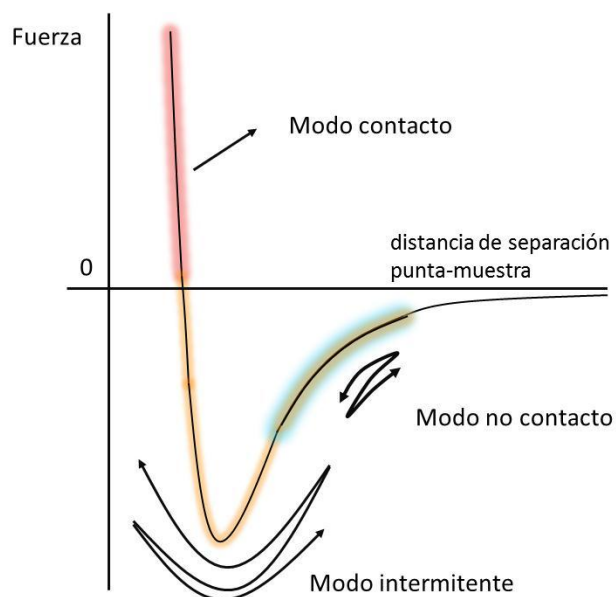


**Figura 2.19.** Vista de los componentes del AFM y los sistemas de alineación.

En el caso del equipo de Molecular Imaging, perteneciente al grupo del Dr. Pasa, el AFM se encuentra además dentro en una cabina hermética, que lo aísla de las vibraciones y permite realizar las medidas a una temperatura controlada.

### 2.2.2.3 Operación del AFM

Se pueden definir distintos modos de operación del AFM en base a la interacción entre la punta y la muestra (**Figura 2.20**), ya sea porque actúen sólo las fuerzas repulsivas, sólo las atractivas o bien una combinación de ambas. Por otro lado, la señal del laser puede ser estática u oscilatoria. La elección del modo de operación dependerá de la naturaleza de la muestra y de qué información se pretende obtener.



**Figura 2.20.** Curva de fuerza en relación a la distancia de separación de la punta con respecto a la muestra. Se muestra en qué zona de la curva operan los modos contacto, no contacto e intermitente.

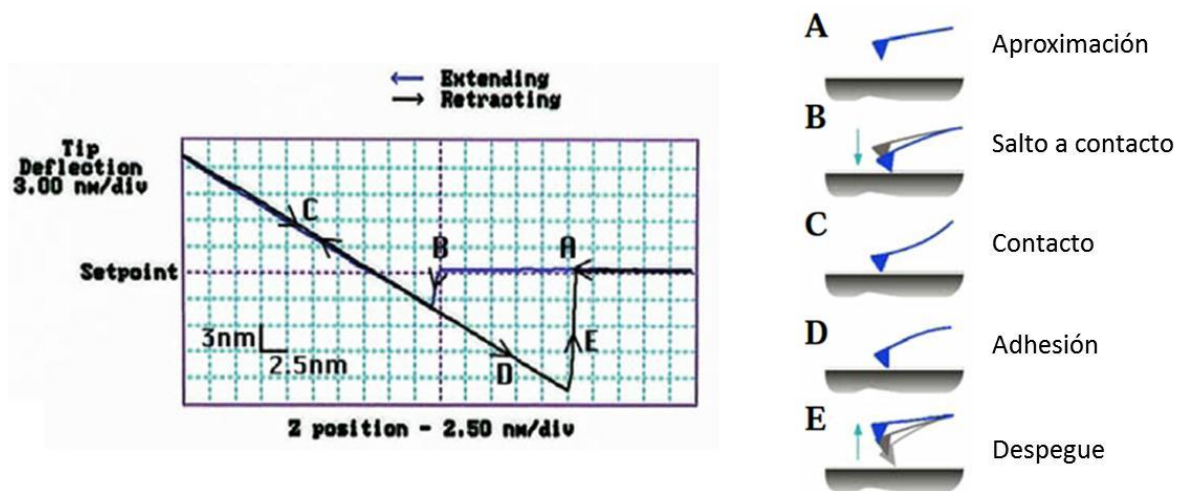
El modo contacto fue el primero en desarrollarse y es el que permite más fácilmente la obtención de imágenes de alta resolución. Una desventaja de este modo es que al estar la punta en contacto con la muestra, no se puede emplear para muestras demasiado blandas, ya que las deforma. Para superar las limitaciones que fueron surgiendo, se desarrollaron los otros modos de operación.



### 2.2.2.3.1 Modo contacto

En el modo contacto operan las interacciones repulsivas, donde la punta tiene un contacto físico débil con la muestra. Por lo tanto, los cantilevers empleados deben poseer bajas constantes de fuerza (0,06 - 0,58 N/m). En este modo, a medida que la punta barre, la deflexión del cantilever proporciona directamente la topografía de la muestra. Es posible obtener además curvas fuerza-distancia, lo cual instauró toda una rama denominada espectroscopía de fuerzas, y practicar técnicas como nanoindentación y nanolitografía.

Una curva fuerza-distancia se puede describir en una serie de pasos (**Figura 2.21**). Cuando la punta se encuentra lejos de la muestra, se considera que tiene deflexión cero (A); a medida que la punta se aproxima a la superficie, normalmente empieza a percibir las fuerzas atractivas hasta que ocurre un “salto”, ya que la punta se encuentra inestable y pasa a estar en contacto con la superficie (B). Como el equipo continúa ordenándole al cantilever que se aproxime a la superficie, la interacción pasa al régimen repulsivo, es decir, la punta está aplicando una fuerza a la muestra y ésta aplica una fuerza opuesta sobre la punta (C). Como el equipo continúa ordenándole al cantilever que se aproxime a la superficie, la interacción pasa al régimen repulsivo, es decir, la punta está aplicando una fuerza a la muestra y ésta aplica una fuerza opuesta sobre la punta (C).



**Figura 2.21.** Descripción de una curva fuerza-distancia.

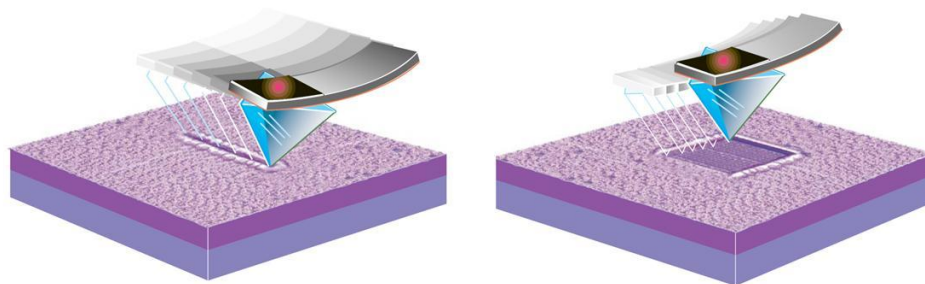
En este régimen, ocurre una combinación entre la flexión del cantilever y la compresión de la muestra de acuerdo a la naturaleza de la muestra y la punta. Si la dirección del movimiento es revertida, la interacción pasa de nuevo al régimen atractivo y la punta permanece en la superficie (D) hasta que ocurre de nuevo la inestabilidad y la punta se despegue de la

superficie (E). Las imágenes de modo contacto se toman en el régimen repulsivo, en valores por encima del punto llamado “*setpoint*” en la **Fig. 2.21**, donde la punta está siempre en contacto con la muestra. Por esta razón, es que las muestras, y además las puntas, pueden resultar modificadas o dañadas durante las medidas.

El principio de operación del modo contacto se basa en que el sistema de retroalimentación del equipo mantiene la deflexión del cantilever a un valor determinado por el operador conocido como punto de ajuste o *setpoint*. El *setpoint* es uno de los parámetros de control más importantes para el operador, el cual se debe ajustar para optimizar la imagen. El *software* del AFM también permite visualizar la señal de deflexión como una curva, a medida que la punta barre la muestra, o bien como una imagen. La señal de deflexión en este caso, es el error de la señal, es decir, el tamaño de la deflexión es la medida de cuánto se está deflectando el cantilever antes que el circuito de retroalimentación “corrija” la altura del piezo. Por lo tanto, en una situación ideal, no existiría contraste en una imagen de deflexión. Zonas de alto contraste en la imagen de deflexión denotan zonas de un gran cambio en altura de la muestra, para los cuales usualmente no es posible que la señal de retroalimentación responda perfectamente.

Además, el AFM puede ser operado de dos modos equivalentes a los discutidos en el caso de STM: a altura constante o fuerza constante. En el primer caso se desactiva la retroalimentación para mantener fija la distancia entre punta y muestra. En el segundo caso, se utiliza la señal debida a la deflexión del cantilever como entrada de un circuito de retroalimentación.

Si en lugar de medir las muestras buscando una interacción no destructiva, se continúa aplicando presión, se lleva a cabo un experimento diferente llamado nanolitografía (**Figura 2.22**).



**Figura 2.22.** Proceso de nanolitografía (esquema extraído de los manuales de Digital Instruments Inc.).

Para ello se debe elegir un cantilever de constante de fuerza adecuada de acuerdo a la dureza del material. Entre otras aplicaciones, esta técnica permite medir la altura de la porción de muestra retirada, trazando un perfil a lo largo de la superficie.

#### 2.2.2.3.2 Modo intermitente

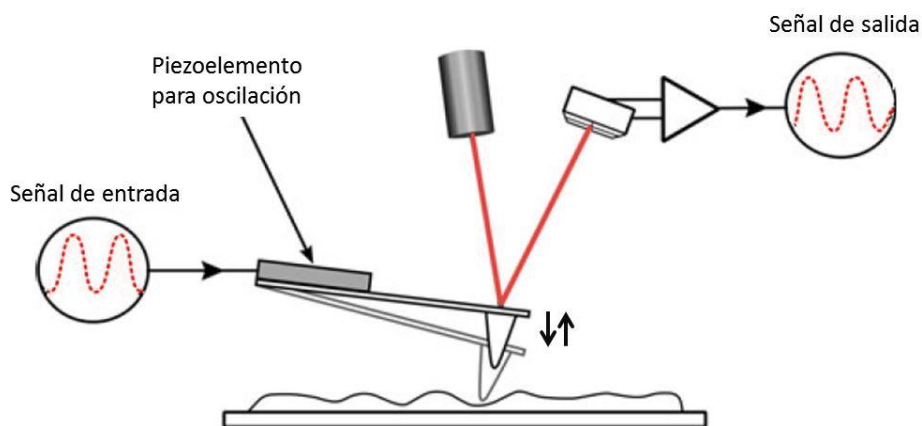
La motivación para usar modos oscilantes en el AFM es poder contar con los beneficios de la relación señal/ruido de las señales moduladas. El cantilever es oscilado, usualmente con un elemento piezoeléctrico adicional, a una frecuencia de resonancia (**Figura 2.23**). A una distancia lejana a la superficie, la frecuencia está dada por:

$$\omega_0 = c \sqrt{k} \quad (2.6)$$

donde  $c$  es una función de la masa del cantilever y  $k$  es la constante de fuerza. Cuando la punta oscilante se aproxima a la superficie, la oscilación cambia debido a la interacción entre la punta y el campo de fuerza de la muestra. Con esta fuerza adicional, la nueva frecuencia de resonancia resulta:

$$\omega_0' = c \sqrt{k - f'} \quad (2.7)$$

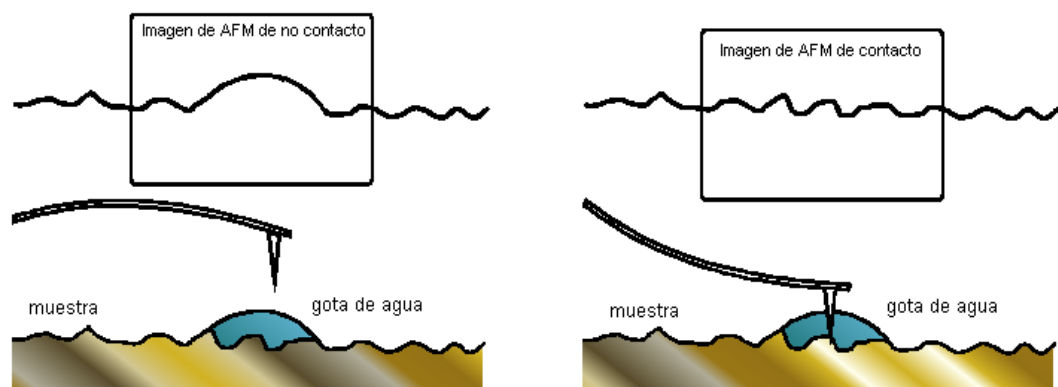
donde  $f'$  es la fuerza normal a la superficie. El efecto es una amortiguación de la oscilación del cantilever, lo cual conduce a una reducción en la frecuencia y la amplitud de la oscilación.



**Figura 2.23.** Esquema generalizado de la operación del AFM en modos oscilantes.

El punto importante aquí es que el circuito de retroalimentación utiliza ya sea el cambio en amplitud o el cambio en fase (que en realidad derivan del cambio en frecuencia) para mantener la punta a una distancia fija de la muestra, tal como en modo contacto.

Si se emplea una oscilación pequeña manteniendo la punta únicamente en el régimen atractivo, se genera el modo conocido como “no contacto” (**Fig. 2.20**). En este modo, la punta debe estar lo suficientemente cerca de la superficie para alcanzar una alta sensibilidad cuidando de no pasar al régimen repulsivo usado para el modo contacto. Para ello, se emplean cantilevers de alta constante de fuerza (42 - 48 N/m) y se debe monitorear los efectos dinámicos de la fuerza atractiva, es decir, el cambio en la oscilación. Una de las limitaciones de este modo en aire, es la capa de contaminación presente en la mayoría de las superficies en condiciones ambientales. Como la punta no hace contacto continuo con la muestra, no es capaz de atravesar, por ejemplo, gotas de agua presentes en la superficie, las cuales se detectan como parte de la topografía (**Figura 2.24**).

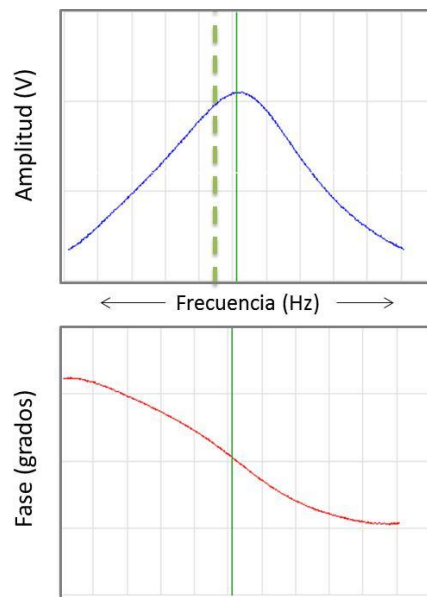


**Figura 2.24.** Inconveniente en las medidas de no contacto por gotas de agua en la superficie.

Si se aplica una oscilación mayor, la punta puede alternar continuamente entre los regímenes atractivo y repulsivo (**Fig. 2.20**), siendo capaz de atravesar la capa de contaminación. Esta técnica se conoce como modo intermitente o *tapping* y es más sencilla de implementar que el modo de no contacto.

En el modo intermitente, la retroalimentación está basada en la amplitud de la modulación. Para operar se debe elegir una frecuencia, que se selecciona mediante el *software* del equipo en un proceso denominado “sintonización del cantilever”. El programa varía la frecuencia de oscilación del piezoelemento hacia arriba y abajo en un rango de

frecuencias fijado, según la naturaleza del cantilever, y muestra la amplitud de oscilación en cada punto. En este rango, la oscilación del cantilever debería ser visible como un único pico (Figura 2.25). La presencia de múltiples picos puede indicar que la punta está dañada o la oblea no está bien sujeta al *holder*. Una vez que el pico está localizado, el operador debe seleccionar la frecuencia de operación, que usualmente se elige a un valor ligeramente menor al máximo, para contemplar el desplazamiento que ocurre al aproximarse la punta a la muestra. Por último, se ajusta la amplitud deseada para el piezoelemento.

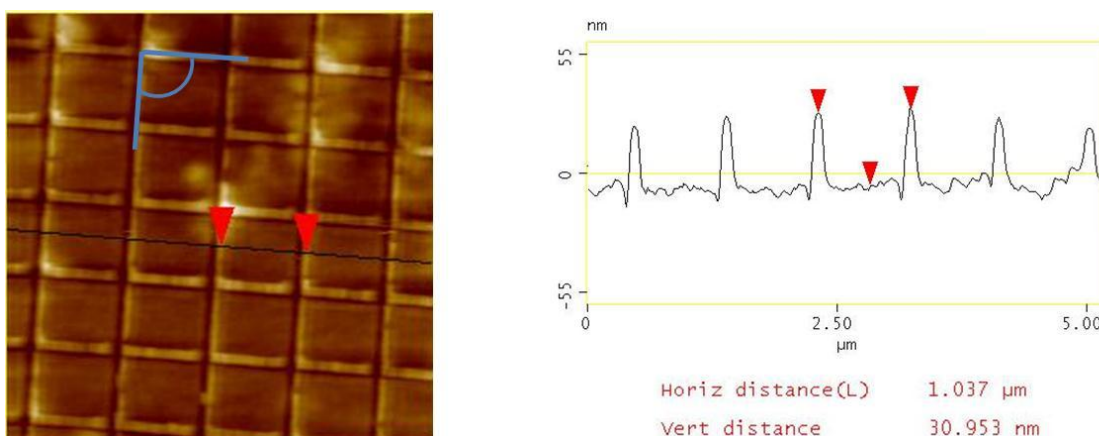


**Figura 2.25.** Gráficos de amplitud y fase vs. frecuencia empleados en la sintonización del cantilever. Se indica con líneas punteadas la frecuencia de operación.

La respuesta de la punta a grandes cambios en topografía es mucho más lenta en el modo intermitente comparado al modo contacto, por lo que los barridos deben llevarse a cabo más despacio. En este modo, la operación en líquidos puede sufrir complicaciones ocasionadas por la excitación mecánica del cantilever, que produce calentamiento. Además, la excitación acústica del cantilever en líquidos da un conjunto de picos en lugar de un único pico agudo como en aire. La resonancia del cantilever se mueve a frecuencias más bajas y es más ancha comparada a la respuesta en aire.

#### 2.2.2.4 Calibración del AFM

Como en el caso del STM, se debe calibrar el microscopio antes de utilizarlo. Para ello se emplean patrones provistos por la empresa fabricante del equipo. Para la calibración en x-y-z se pueden emplear grillas de cobre de un micrómetro de separación entre cuadrados y  $\sim 31$  nm de altura (**Figura 2.25**). Además, es posible verificar el funcionamiento del *scanner* a partir de la ortogonalidad del ángulo observado en los cuadrados.



**Figura 2.25.** Calibración x-y-z del AFM con una grilla de cobre de 1  $\mu\text{m}$  de separación.

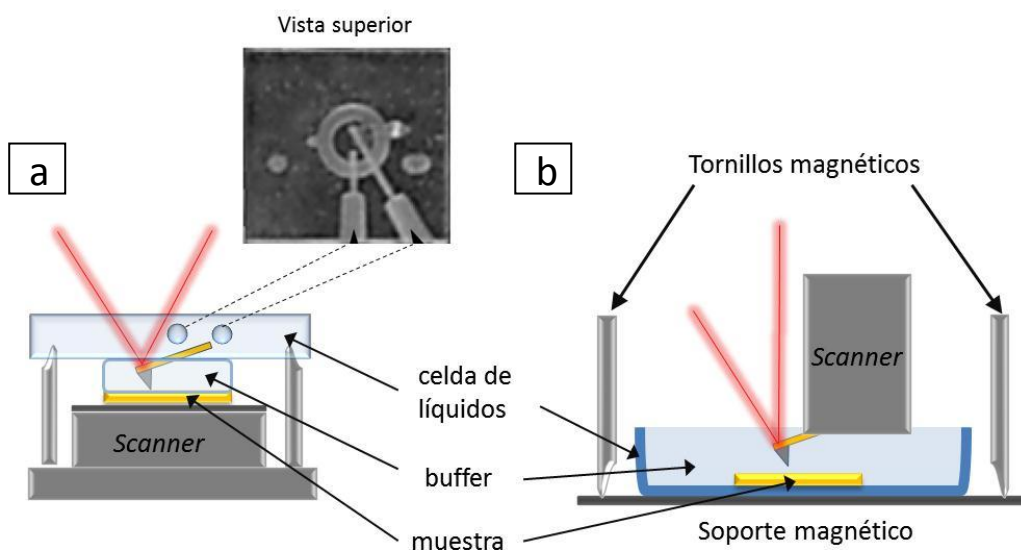
#### 2.2.2.5 Arreglo experimental

Para las medidas realizadas en La Plata, se empleó un microscopio Nanoscope V de Digital instruments Inc. (Santa Barbara, California) en los modos contacto e intermitente. En el laboratorio del Dr. André Pasa en Florianópolis (Brasil), se contó con un microscopio PicoScan de Molecular Imaging operando en modo contacto.

En todos los casos, se emplearon cantilevers triangulares de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  con constantes de fuerza nominales entre 0,06 y 0,58 N/m, adquiridos a Veeco Probes y *scanners* de tamaño mediano que permiten barrer campos de hasta 12,7  $\mu\text{m}$  en el caso del Nanoscope V y 20  $\mu\text{m}$  en el caso del PicoScan.

Las medidas *in situ* se llevaron a cabo en las celdas de líquido propias de cada equipo. En el Nanoscope V, la celda es de vidrio y posee un clip para sostener el cantilever tal como el *holder* para medidas *ex situ*, siendo el laser capaz de traspasarla sin inconvenientes (**Figura**

**2.26a).** El líquido se agrega por un orificio lateral con una pipeta automática y queda retenido por capilaridad entre la celda y la muestra. El agregado del líquido debe hacerse con extremo cuidado, ya que la presencia de burbujas perjudica o impide las medidas ya que obstruyen el camino óptico del laser. Dependiendo de la hidrofiliicidad de la muestra los volúmenes agregados fueron de 30 - 40  $\mu\text{L}$ . En este diseño, es imprescindible secar al menos parcialmente la muestra antes de ingresarla al microscopio.



**Figura 2.26.** Esquema de la disposición de las celdas de líquido en a) Nanoscope V y b) PicoScan.

En el PicoScan (**Figura 2.26b**), esto no es necesario, ya que el *scanner* se encuentra por encima de la muestra. La celda se deposita sobre un disco magnético, el cual se coloca posteriormente gracias al contacto de los tornillos magnéticos. Sin embargo, ya que la muestra debe adherirse a la celda, por ejemplo con una cinta bifaz, existe la posibilidad de que ésta genere contaminantes durante las medidas.

Para todas las medidas se empleó buffer HEPES 10 mM + 0,9 % NaCl a pH 7,4, ya que en general se obtiene una mejor calidad de imagen con buffers de baja fuerza iónica.

El control de temperatura en el PicoScan se llevó a cabo mediante una cabina adquirida a Molecular Imaging mientras que las medidas en el Nanoscope V se realizaron a temperatura ambiente.

El análisis de imágenes adquiridas en el Nanoscope V se llevó a cabo mediante el *software* proporcionado por Digital instruments Inc. mientras que para el PicoScan se empleó el *software* libre de Nanotec Electronica S. L. WSxM 5.0.

## 2.3 Espectroscopía de fotoelectrones por rayos X (XPS)

La espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS, X-ray photoelectron spectroscopy) se fundamenta en el efecto fotoeléctrico. Este fenómeno fue descubierto en 1887 por Heinrich Rudolf Hertz y sus bases teóricas fueron explicadas por Albert Einstein en 1905, quien se basó en los trabajos de Max Planck para su formulación. Sin embargo, no fue sino hasta mediados de la década de los '50 en que se desarrolló como técnica analítica, gracias a los trabajos pioneros del grupo de Kai M. Siegbahn, quien obtuvo el Premio Nobel de Física en 1981 por sus contribuciones al desarrollo de la espectroscopía electrónica.<sup>f</sup>

Esta técnica permite detectar con mucha sensibilidad los distintos estados químicos de los elementos, a excepción del hidrógeno y el helio. Se pueden analizar muestras gaseosas, líquidas o sólidas, siendo la profundidad de análisis en materiales sólidos para los primeros 10 nm, con un tamaño de área examinada mínima de unos 30  $\mu\text{m}$   $\times$  30  $\mu\text{m}$ . Es aplicable a metales, semiconductores y cerámicos como así también, con ciertos recaudos, a materiales orgánicos, biológicos y poliméricos. Se trata de una técnica no destructiva aunque hay casos en los que el haz de rayos X puede dañar la muestra, sobre todo si ésta es orgánica. Debido a que es frecuentemente utilizada para análisis químico, se la denominó también espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA, *electron spectroscopy for chemical analysis*).

### 2.3.1. Principios básicos

Un haz de partículas incidente puede dispersarse elásticamente o bien causar una transición electrónica en un átomo. Tanto la partícula dispersada como la energía de la radiación emergente contendrán la "firma" del átomo debido a que los niveles de energía en la transición son característicos para cada átomo. Por lo tanto, las medidas del espectro de energía de la radiación emergente permiten la identificación del átomo en sus distintos estados de oxidación, así como la intensidad puede ser empleada para cuantificación.

---

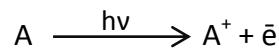
<sup>f</sup> "The Nobel Prize in Physics 1981". [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1981/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1981/)



En la región de rayos X (0,1 keV – 0,1 MeV),<sup>g</sup> los fotones tienen energía suficiente para penetrar los sólidos e interactuar con los electrones de la estructura interna. Los fotones de menor energía que establecen el espectro visible interactúan con los electrones más externos, menos fuertemente unidos. Estos electrones están involucrados en las uniones químicas y no están asociados a átomos específicos, por lo tanto, carecen de utilidad para la identificación elemental.

El proceso básico de interés en la espectroscopía de fotoelectrones es la absorción de un cuanto de energía  $h\nu$  y la eyección de un electrón, conocido como fotoelectrón, cuya energía cinética, referida a un cero de energía apropiado, está relacionada a la energía de unión del electrón al átomo blanco. En este proceso, el fotón incidente transfiere su energía por completo al electrón unido y se logra la identificación del elemento por la medida de la energía de los electrones que se desprenden de la muestra sin pérdida de energía.

Cuando un fotón de suficiente energía colisiona contra un electrón de un nivel electrónico interno produce un electrón libre eyectado en un proceso conocido como fotoemisión:



Si la energía se conserva, se cumple que:

$$E(A) + h\nu = E(A^+) + E(\bar{e}) \quad (2.8)$$

Debido a que la energía del electrón está presente únicamente como energía cinética, podemos reescribir la ecuación (2.8) como:

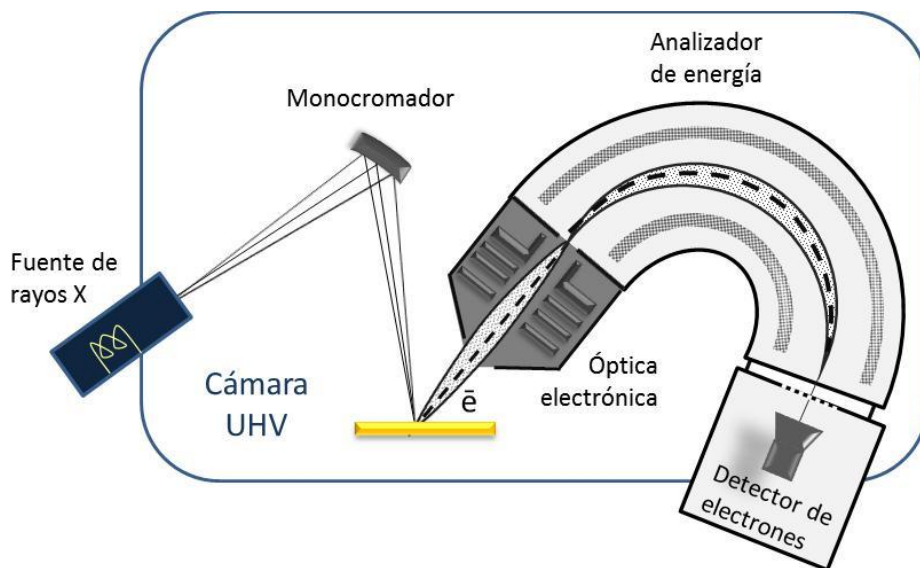
$$E_k(\bar{e}) = h\nu - [E(A^+) - E(A)] \quad (2.9)$$

El término entre corchetes representa la diferencia de energía entre el átomo ionizado y el neutral y se denomina energía de unión del electrón,  $E_B$ , que conduce a la ecuación de Einstein para el efecto fotoeléctrico:

$$E_k = h\nu - E_B \quad (2.10)$$

<sup>g</sup> como unidad de energía se emplean los electrón-volt;  $1\text{eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$  es la energía cinética ganada por un electrón acelerado respecto al resto con una diferencia de potencial de 1 V, teniendo en cuenta que la carga del electrón es  $1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$  y  $1 \text{ J} = 1 \text{ C} \cdot \text{V}$ .

Las energías de unión se expresan respecto a un nivel de referencia, por ejemplo, para sólidos se utiliza como referencia el nivel de Fermi. De acuerdo a la ecuación (2.10), conociendo la energía de la fuente de rayos X, es posible determinar la medida de  $E_B$  a partir de  $E_K$ . Para ello, es necesario contar con una fuente de radiación (si es posible monocromática), un espectrómetro de electrones y una cámara de ultra alto vacío (UHV, *ultra high vacuum*) (**Figura 2.27**). La energía de los fotoelectrones se determina por la deflexión en un campo electrostático o magnético. El sistema de detección se basa en la ganancia provista por los multiplicadores electrónicos; comúnmente se emplean los *channeltron*. Este tipo de amplificador consiste en un tubo de alta resistividad con una abertura cónica, donde los electrones incidentes crean una lluvia de electrones secundarios que al golpear las paredes del tubo vuelven a crear más electrones secundarios, alcanzando una ganancia de  $10^8$ .



**Figura 2.27.** Esquema de un espectrómetro para XPS.

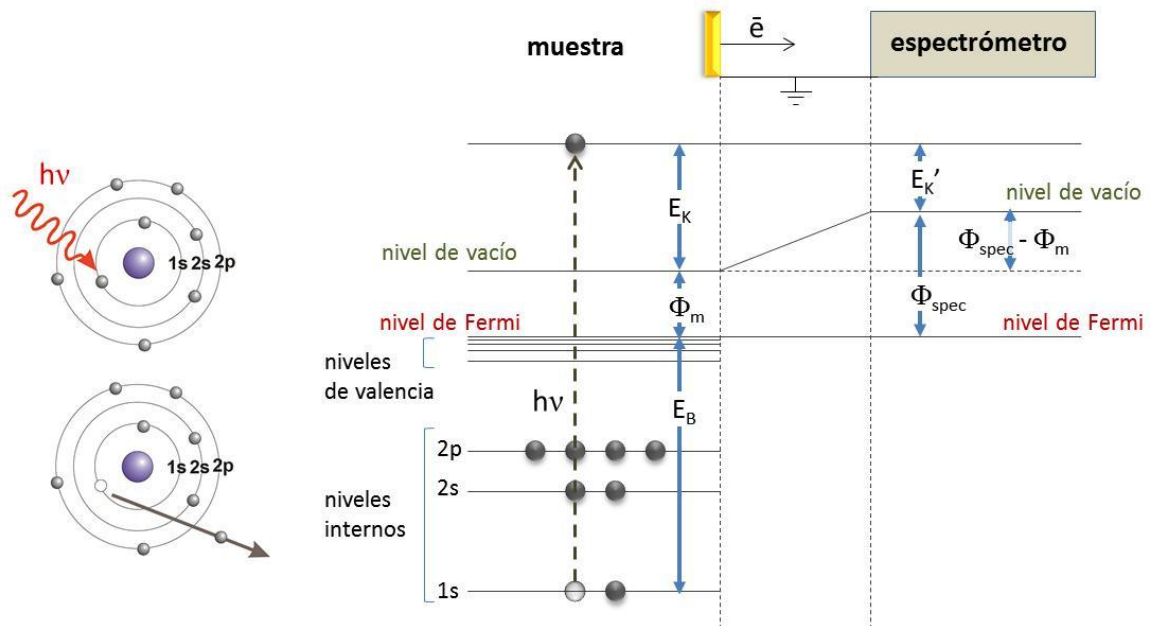
En el caso de una muestra sólida, es necesario hacer un contacto eléctrico con el espectrómetro, estableciéndose los niveles de energía que se esquematizan en la **Figura 2.28** (utilizando como ejemplo una muestra metálica). Como la muestra y el espectrómetro se encuentran en equilibrio termodinámico, sus niveles de Fermi son iguales. Al pasar de la muestra al espectrómetro, el fotoelectrón percibirá un potencial igual a la diferencia entre la función de trabajo del espectrómetro  $\Phi_{\text{spec}}$  y la función de trabajo de la muestra  $\Phi_m$ . Por lo tanto, la  $E_K$  del electrón se mide como  $E_K'$  dentro del analizador del espectrómetro:

$$E_K = E_K' + (\Phi_{\text{spec}} - \Phi_m) \quad (2.11)$$

Teniendo en cuenta que:  $h\nu = E_B + \Phi_m + E_K \quad (2.12)$

Resulta:  $E_B = h\nu - (E_K' + \Phi_{\text{spec}}) \quad (2.13)$

donde la  $E_B$  es la energía de unión referida al nivel de Fermi. Cabe destacar que en la ecuación (2.13) no está involucrada  $\Phi_m$  pero sí  $\Phi_{\text{spec}}$ . Midiendo la energía cinética de los electrones con un espectrómetro correctamente calibrado y empleando una fuente de radiación conocida, se obtienen los espectros de cuentas en función de la energía cinética, la cual se puede transformar a energía de unión simplemente aplicando la ecuación (2.13).



**Figura 2.28.** Diagrama de niveles de energía electrónicos de una muestra metálica en contacto con un espectrómetro.

### 2.3.2. Espectros de XPS

Antes de analizar las características de los espectros conviene establecer la notación empleada para referirse a los niveles energéticos de la fuente de rayos X y de las muestras, la cual se resume en la **Tabla 2.1**.

**Tabla 2.1.** Notación empleada en espectroscopías de rayos X.

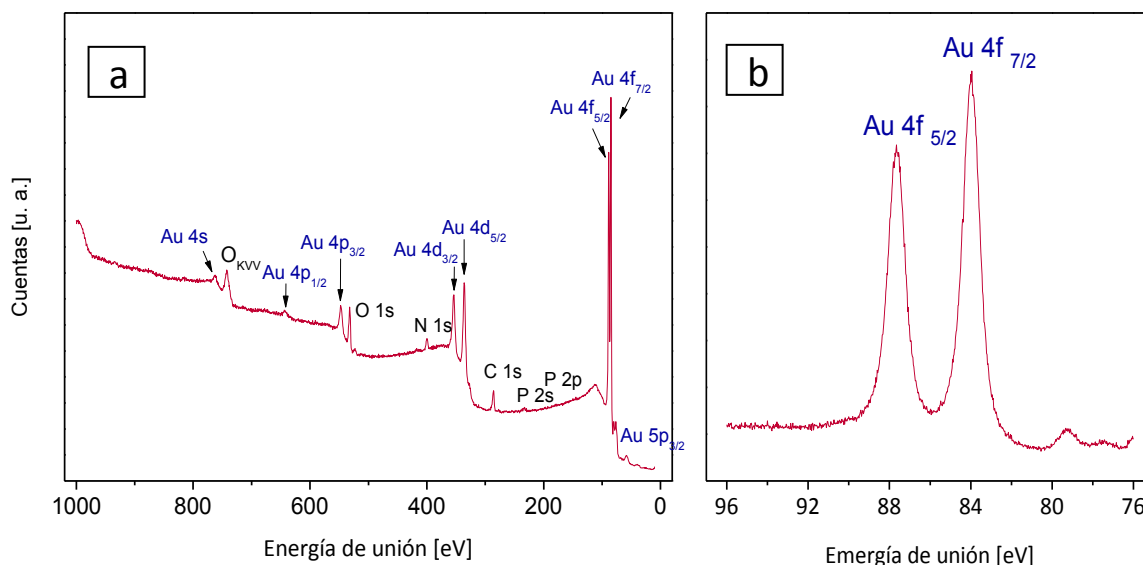
Números cuánticos			Sufijo para rayos X	Nivel de rayos X	Nivel espectroscópico
$n$	$l$	$j^h$			
1	0	1/2	1	K	1s <sub>1/2</sub>
2	0	1/2	1	L <sub>1</sub>	2s <sub>1/2</sub>
2	1	1/2	2	L <sub>2</sub>	2p <sub>1/2</sub>
2	1	3/2	3	L <sub>3</sub>	2p <sub>3/2</sub>
3	0	1/2	1	M <sub>1</sub>	3s <sub>1/2</sub>
3	1	1/2	2	M <sub>2</sub>	3p <sub>1/2</sub>
3	1	3/2	3	M <sub>3</sub>	3p <sub>3/2</sub>
3	2	3/2	4	M <sub>4</sub>	3d <sub>3/2</sub>
3	2	5/2	5	M <sub>5</sub>	3d <sub>5/2</sub>
etc.			etc.	etc.	etc.

Si se toma un espectro amplio, se obtiene una serie de picos sobre una línea de fondo (*background*) que generalmente aumenta escalonadamente hacia mayores energías de unión debido a procesos inelásticos de fotoemisión (**Figura 2.29a**). Cada fuente de rayos X (Mg K $\alpha_{1,2}$ , Mg K $\alpha_{3,4}$ , Al K $\alpha$ , etc.) da una serie de picos de fotoelectrones que reflejan las  $E_B$  discretas de los electrones presentes en el sólido. Estos picos pueden agruparse en 3 tipos básicos: los picos de fotoemisión de niveles internos, los correspondientes a niveles de valencia y aquellos debidos a emisión Auger (series Auger).

Los picos de valencia aparecen a bajas energías de unión (0 – 20 eV) formando una estructura de banda. Por otro lado, después de la emisión de un electrón interno, como por ejemplo los 1s de la capa K, queda un hueco en la estructura. El hueco puede ser llenado por un electrón de la capa L o de la banda de valencia V llevando la energía de otro electrón L o V. Este proceso denominado Auger constituye la desexcitación dominante en elementos livianos ( $Z < 35$ ), dando líneas características (KLL, LMM, LMV, etc.) que se pueden emplear también para la identificación de elementos (en la **Fig. 2.29a** se muestra la línea del O<sub>KVV</sub>). Los picos Auger se pueden identificar fácilmente ya que no dependen de la fuente de radiación empleada.

<sup>h</sup> Si se tiene en cuenta la interacción spin-orbital, los operadores tradicionales ( $l$ ,  $m$  y  $s$ ) ya no conmutan con el Hamiltoniano y sus autovalores cambian con el tiempo. Por esta razón, se usa otro juego de números cuánticos, donde  $j = l + s$  ( $j = 1/2, 3/2, \dots, n-1/2$ ) es el número cuántico de momento angular total.

A menos que los electrones emitidos se reemplacen, la muestra se cargará respecto del espectrómetro generando en la superficie de la muestra un campo eléctrico retardador. Para muestras conductoras conectadas al espectrómetro, el balance de carga se restaura fácilmente, sin embargo, en materiales aislantes los electrones deben ser reemplazados mediante una fuente externa.



**Figura 2.29.** a) Espectro de XPS de un sustrato de Au modificado con FAD excitado con Mg K $\alpha$ . b) Espectro XPS de alta resolución para Au 4f, donde se puede apreciar el doblete característico.

En la **Fig. 2.29a** podemos ver el espectro de un sustrato de Au modificado con FAD (Flavina-Adenina Dinucleótido) empleando como fuente de radiación Mg K $\alpha$ . Esta fuente sólo es suficientemente energética para interactuar con los electrones de la capa 4s del Au en adelante. Se puede destacar, que los picos tienen intensidades variables y que excepto los subniveles s, los otros subniveles aparecen como dobletes (**Fig. 2.29b**). Los dobletes surgen del acoplamiento spin-orbital ( $j-j$ ) y la diferencia de energía entre los dos estados (en la **Fig. 2.29b**, Au 4f<sub>5/2</sub> y Au 4f<sub>7/2</sub>),  $\Delta E_j$ , refleja la naturaleza “paralela” o “antiparalela” de los vectores de momento angular del spin y el orbital. La separación en energía  $\Delta E_j$  aumenta con el incremento de Z para un subnivel dado ( $n$ ,  $l$  constantes) o bien aumenta al disminuir  $l$  para  $n$  constante (en **Fig. 2.29a**, 4p > 4d > 4f).

Es importante notar que las intensidades de los picos de los diferentes niveles energéticos no son iguales, debido a que la probabilidad de fotoeyección desde cada orbital

(llamada sección transversal de fotoionización,  $\sigma$ ) es diferente. La probabilidad también varía para un orbital dado en diferentes átomos y depende de la energía de los rayos X utilizados. Para un átomo de P por ejemplo, utilizando rayos X de Mg K $\alpha$ , la sección transversal para el nivel 2s,  $\sigma_{P_{2s}}$ , es mayor que  $\sigma_{P_{2p}}$ , por lo que el pico de XPS del P 2s es mayor que el P 2p.

Entonces, el número de picos en el espectro corresponde al número de niveles de energía ocupados en los átomos cuyas  $E_B$  son menores que la energía de los rayos X,  $h\nu$ ; la posición de los picos mide directamente las  $E_B$  de los electrones en los orbitales e identifica los átomos en cuestión. Las intensidades de los picos dependen del número de átomos presentes y del valor de  $\sigma$  para el orbital considerado. Todos estos puntos dependen de la consideración de que los electrones se comportan como partículas independientes, es decir, los niveles de energía de uno de ellos no es afectado por los otros. Esto es sólo una aproximación y características adicionales pueden aparecer en el espectro si se consideran las implicancias de los electrones pasivos (no fotoeyectados).

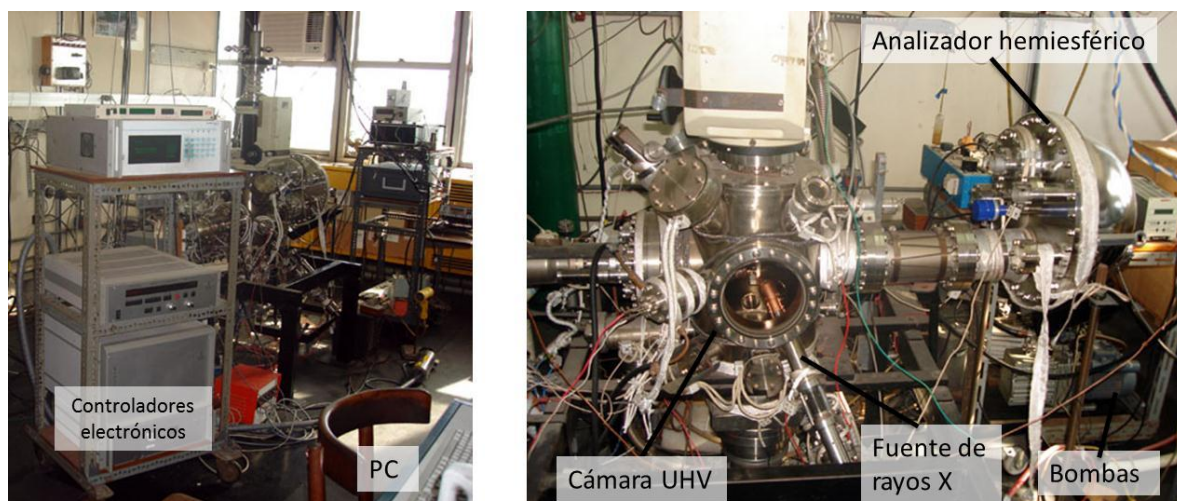
En realidad, la energía de unión exacta para un electrón en un elemento depende del entorno químico en el que se encuentra dicho elemento. De hecho, el valor de  $E_B$  cambia de acuerdo al entorno, lo que se denomina corrimiento químico (por analogía a la técnica de resonancia magnética nuclear, RMN). En los niveles internos, la energía del electrón está determinada por las interacciones coulómbicas con otros electrones y por el potencial de atracción del núcleo. Cualquier cambio en el entorno químico involucra una redistribución espacial en los electrones de valencia produciendo una variación en la carga del átomo y la creación de un potencial diferente, que será percibido por los electrones internos, lo cual resulta en un cambio en sus  $E_B$ . Este hecho es quizá el más relevante en las aplicaciones de XPS como técnica analítica, ya que de este modo, se pueden detectar distintos estados de oxidación, átomos vecinos en una molécula, diferentes sitios de adsorción, etc.

Por último, para cuantificar los espectros de XPS, se debe tener en cuenta la intensidad y la posición de los picos. Entre otros valores, el ancho de banda a mitad del máximo (*fwhm*, *full width at half maximum*) es un indicador útil para el número de enlaces involucrados, daño por rayos X y carga diferencial en la superficie. Los criterios a seguir para cuantificar una región incluyen definir un rango de energías en la cual la señal pueda ser atribuida a la transición de interés y la correcta remoción de la señal de fondo que no corresponde al pico. Cuando existe interferencia por distintas contribuciones de picos en

una misma señal, se debe hacer un ajuste adecuado mediante un modelo típicamente creado por medio de curvas Gaussianas/Lorentzianas (deconvolución).

### 2.3.3. Arreglo experimental

Como se mencionó anteriormente, los equipos de XPS constan de diferentes componentes. Se utiliza una cámara de ultra alto vacío (UHV) con presiones del orden de  $10^{-10}$  torr para disminuir la cantidad de contaminantes superficiales y asegurar a los electrones eyectados un camino libre medio lo suficientemente grande como para que lleguen al analizador sin chocar con otras moléculas. Estas cámaras son de acero inoxidable con juntas metálicas correctamente selladas (**Figura 2.30**). Las bajas presiones se alcanzan con una serie de bombas de prevacío (rotatorias de aceite) y de vacío (difusoras y turbomoleculares). Además, se calienta la cámara para evacuar los gases adsorbidos en un proceso conocido como horneado. Las muestras se colocan en un portamuestras de material inerte y se introducen en la cámara a través de un manipulador.



**Figura 2.30.** Componentes del equipo para XPS.

La fuente de rayos X proviene del bombardeo con electrones de blancos de Mg o Al (XR50, Specs GmbH). La energía de los rayos X emitidos es del orden de 1 keV (para Mg K $\alpha$  es 1253,6 eV con un ancho de banda de 0,7 eV y para Al K $\alpha$  es 1486,6 eV con un ancho de banda de 0,85 eV), es decir que son rayos X blandos. La línea elegida es lo suficientemente

alta como para obtener un rango de energía apreciable, sin limitar la resolución. A pesar de que la radiación empleada no es monocromática, la radiación continua de frenado (*Bremsstrahlung*) de los rayos X no es importante en las regiones de espectro analizadas.

La medida de la energía de los electrones eyectados se realizó mediante el análisis de su deflexión en un campo electrostático. El analizador hemiesférico (PHOIBOS 100, Specs GmbH) aplica un potencial a través de dos sectores concéntricos y los electrones pasan sin cambio de energía a lo largo de líneas equipotenciales. Como sistema de detección se empleó un multiplicador de electrones *channeltron*.

La calibración de la escala de energía se realizó a dos puntos utilizando oro evaporado ( $E_B \text{ Au } 4f_{7/2} = 84,00 \text{ eV}$ ) y cobre ( $E_B \text{ de Cu } 2p_{3/2} = 933,67 \text{ eV}$ ) como patrones de referencia.

Las medidas de XPS realizadas en este trabajo de Tesis se llevaron a cabo en el INIFTA y estuvieron a cargo del Dr. G. Benitez y el Dr. Aldo Rubert, así como también realizaron la deconvolución apropiada de los espectros de alta resolución para su respectiva cuantificación.

## 2.4 Espectroscopía Raman amplificada por superficies (SERS)

A pesar que la dispersión inelástica de la luz había sido predicha por Adolf Smekal en 1923, no fue sino hasta 1928 que fue observada en la práctica. El efecto Raman fue denominado en honor a uno de sus descubridores, Sir Chandrasekhara V. Raman, quien junto a K. S. Krishnan observó este fenómeno tratando de estudiar la dispersión de luz en líquidos. Raman ganó el premio Nobel de Física en 1930<sup>i</sup> por su descubrimiento, llevado a cabo usando luz solar, un filtro fotográfico de banda fina para crear luz monocromática y un filtro “cruzado” para bloquear esta luz monocromática, encontrando por simple observación que la luz cambiaba de frecuencia al pasar por el filtro “cruzado”.

La teoría del efecto Raman fue desarrollada luego por George Placzek entre 1930 y 1934. En ese entonces, las lámparas de mercurio se habían convertido en la principal fuente de luz y se empleó primero detección fotográfica para luego pasar a la detección espectrofotométrica. Hoy en día, se emplean lasers como fuente de luz.

---

<sup>i</sup> "The Nobel Prize in Physics 1930". [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1930/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1930/)



La espectroscopía Raman detecta las vibraciones de las moléculas basándose en la dispersión Raman. De este modo, provee información de la estructura química y forma física, identifica sustancias por sus patrones espectrales característicos (“huella digital”), y determina cuantitativa o semicuantitativamente la cantidad de sustancia en una muestra. Las muestras pueden ser analizadas en un amplio rango de estados físicos, ya sean sólidos, líquidos o vapores, así como material masivo (*bulk*), partículas o películas delgadas. Sin embargo, no se convierte en una técnica tan difundida como la espectroscopía infrarroja, principalmente debido a la baja intensidad de las señales, ya que tan sólo 1 de  $\sim 10^7$  fotones sufre dispersión Raman.

En 1974, Fleischman, Hendra y McQuillan observaron un inesperado aumento de la intensidad Raman en la señal proveniente de piridina depositada sobre un electrodo de Ag rugoso. Los autores adjudicaron el fenómeno a la gran superficie expuesta de los sustratos, sin embargo, Jeanmaire y Van Duyne en paralelo con Albrecht y Creighton demostraron que la intensidad se debía a más que a un aumento del área superficial. El incremento en intensidad por el rugosado del electrodo de Ag sería de un factor de 10 mientras que el aumento observado era del orden de  $10^6$ . A este efecto se lo denominó entonces dispersión Raman amplificada por superficies (SERS, *Surface Enhanced Raman Scattering*).

Desde ese entonces, diversas geometrías de superficies, además de sustratos de distinta naturaleza, se han empleado para obtener espectros SERS. Debido a la gran intensidad de las señales obtenidas, esta variante espectroscópica tiene un gran potencial en la identificación de moléculas presentes en pequeñas cantidades, siendo incluso posible la detección de una única molécula.

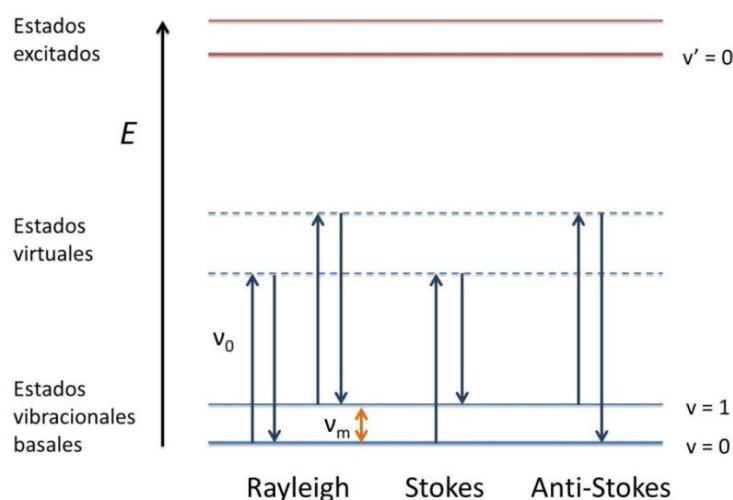
#### **2.4.1 Efecto Raman**

Cuando un haz de luz incide sobre la superficie de un material es en parte reflejado debido al contraste entre los índices de refracción de los distintos medios. Por otra parte, la porción restante de luz incidente es transmitida al interior del material siguiendo las relaciones de Fresnel. Asimismo, la luz transmitida puede ser absorbida (fundamento para las técnicas de espectroscopía UV-visible e infrarroja) o bien puede ser dispersada por el material. La energía de las ondas electromagnéticas absorbidas por el medio es finalmente

disipada, y puede en parte ser reemitida como luz con una frecuencia diferente. En moléculas, al mecanismo de reemisión de luz se lo conoce como fluorescencia o fosforescencia, según la naturaleza del decaimiento electrónico que la produjo.

Por otra parte, la dispersión de la luz en el medio se debe a la interacción con heterogeneidades del material. Estos procesos se clasifican según la naturaleza de estas heterogeneidades y según el tipo de interacción involucrada. La dispersión Rayleigh, es un proceso de dispersión elástica con imperfecciones del material (defectos como por ej. dislocaciones, vacancias, etc.) en donde la onda dispersada conserva la misma energía que la onda incidente. Si la dispersión es inelástica hay dos tipos de interacciones posibles: con excitaciones acústicas, conocida como dispersión Brillouin, o con otro tipo de excitaciones elementales (vibraciones moleculares, fonones ópticos, etc.) denominada dispersión Raman.

El efecto Raman ocurre cuando la luz que incide sobre una molécula interactúa y distorsiona (polariza) su nube electrónica. Para ello, el fotón excita la molécula desde su estado basal hasta un estado de energía “virtual” transitorio (de menor energía que el estado excitado) que dependerá de la fuente de luz empleada (**Figura 2.31**). Cuando la molécula se relaja emite un fotón y regresa a un estado rotacional o vibracional diferente con un momento dipolar inducido. La diferencia de energía entre el estado original y el nuevo estado lleva a un corrimiento de la frecuencia del fotón emitido respecto de la longitud de onda de excitación.

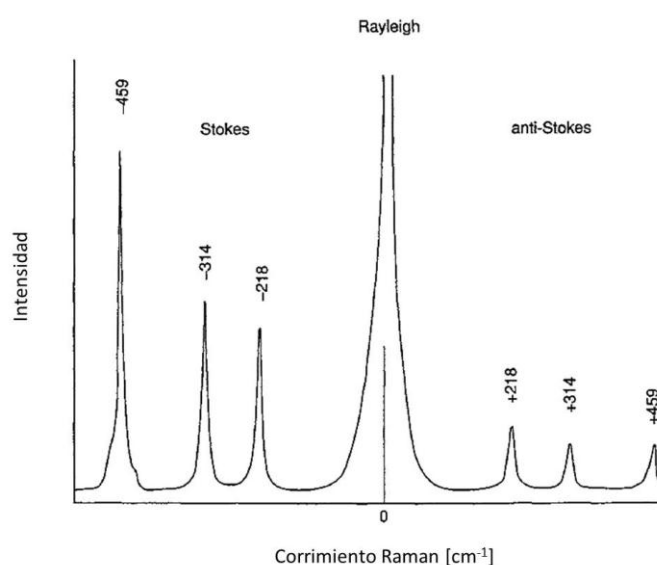


**Figura 2.31.** Diagramas de Jablonski simplificados ilustrando los procesos de dispersión Rayleigh y Raman (Stokes y Anti-Stokes) para una irradiación con  $h\nu_0$ .

Para que esto ocurra, debe existir un movimiento nuclear ya que si sólo interviene una distorsión en la nube electrónica, la dispersión será elástica. De hecho, la dispersión Rayleigh es la dominante mientras que la dispersión Raman involucra sólo 1 de cada  $10^6$ - $10^8$  fotones.

Es necesario que haya un cambio en el potencial de polarización molecular (deformación de la nube electrónica) respecto del estado vibracional para que una molécula exhiba el efecto Raman, así la magnitud del cambio en la polarizabilidad determinará la intensidad de la dispersión Raman. Usualmente, son las vibraciones simétricas las que causan los mayores cambios y dan mayor dispersión Raman. El patrón de corrimiento de frecuencias está determinado por los estados rotacionales, vibracionales e incluso electrónicos de la muestra.

A temperatura ambiente, la mayor parte de las moléculas, pero no todas, se encuentra en el nivel vibracional de menor energía de acuerdo a la ley de distribución de Maxwell-Boltzmann. Después de la irradiación con  $h\nu_0$ , si el estado vibracional final de la molécula es más energético que el estado inicial, entonces el fotón emitido se verá desplazado a una frecuencia menor para que la energía total del sistema permanezca balanceada. Este tipo de corrimiento se lo conoce como Stokes ( $\nu_0 - \nu_m$ ) (**Fig. 2.31**). Contrariamente, si el estado vibracional final es menos energético que el estado inicial, entonces el fotón emitido será desplazado a mayores frecuencias y a este proceso se lo designa corrimiento Anti-Stokes ( $\nu_0 + \nu_m$ ) (**Fig. 2.31**). Debido a que la población de moléculas es mayor en el estado  $v = 0$  respecto de  $v = 1$ , las líneas Stokes son mucho más intensas que las Anti-Stokes (**Figura 2.32**).



**Figura 2.32.** Espectro Raman de  $\text{CCl}_4$  tomado con un laser de excitación de 488,0 nm (extraído de *Introductory Raman Spectroscopy* de Ferraro, Nakamoto y Brown).

En espectroscopía Raman, la muestra se irradia con un laser intenso en la región UV-visible y la luz dispersada se detecta perpendicular ( $90^\circ$ ) o paralelamente ( $180^\circ$ ) al haz incidente (detección polarizada). La dispersión se expresa como corrimiento de energía respecto del laser de excitación y, aunque debería referirse como  $\Delta\text{cm}^{-1}$ , se expresa comúnmente como  $\text{cm}^{-1}$  (**Fig. 2.32**). La dispersión Raman se registra para energías menores que el haz incidente para dar dispersión Stokes, pero en ocasiones se prefiere la dispersión Anti-Stokes, de modo de evitar interferencias ocasionadas por fluorescencia.

El estado “virtual” que se postuló anteriormente puede ser considerado como una perturbación, la cual no necesariamente posee una interpretación física. Sin embargo, si la energía del estado virtual transitorio coincide con uno de los niveles electrónicos (vibrónicos) verdaderos de la molécula, entonces se da el fenómeno de dispersión Raman *resonante* (RRS, *resonant Raman scattering*). Este efecto es particularmente intenso en moléculas cuyas energías electrónicas son cercanas a la energía del laser de excitación. Por ejemplo, los colorantes (rodamina, cristal violeta, azul de metileno, etc.) pueden exhibir intensidades Raman  $10^6$  veces mayores a las intensidades normalmente registradas para otras sustancias.

#### 2.4.2 Amplificación por superficies

El aumento en la dispersión Raman propiciada por la cercanía de las moléculas a una superficie consiste en grandes incrementos de campo locales debidos a ciertas características intrínsecas a la naturaleza metálica de la superficie. Estas superficies tienen las propiedades adecuadas para sostener la resonancia de plasmones en el rango visible/infrarrojo cercano (400 – 1000 nm), lo cual conduce a que posean las propiedades ópticas apropiadas para SERS.

En los metales, un *plasmón* es una oscilación cuantizada de la densidad de carga de los electrones libres (plasma de estado sólido), es decir, una cuasi-partícula cuántica que representa las excitaciones elementales, o modos, de las oscilaciones en la densidad de carga. Los plasmones tienen una gran importancia en las propiedades ópticas de los metales. La luz de frecuencia menor a la frecuencia del plasma es reflejada, ya que los electrones en el metal apantallan el campo eléctrico de la luz, mientras que la luz de frecuencia mayor es

transmitida porque los electrones no pueden responder lo suficientemente rápido para apantallarla. En la mayor parte de los metales la frecuencia del plasma está en el UV, haciéndolos brillantes (reflectivos) en el rango visible. Algunos metales, como el cobre y el oro, tienen transiciones electrónicas interbanda en el rango visible, por lo que absorben luz de energías específicas (colores), dando su color distintivo.

Los plasmones superficiales son aquellos que están confinados en la superficie y que pueden interactuar fuertemente con la luz para dar un *polaritón*, que se puede definir como un fotón fuertemente acoplado a los grados de libertad del medio. Por lo tanto, las ondas electromagnéticas presentes en un metal son debidas a ondas de densidad de carga debidas a plasmones/polaritones.

Entonces, una superficie metálica simple que exhibiera estas propiedades podría ser considerada un sustrato adecuado para SERS. Por otro lado, las superficies que mayor amplificación proporcionan son los coloides de Ag y Au de 10 – 100 nm. Esta observación debe vincularse con el hecho de que en las dimensiones nanométricas las propiedades difieren significativamente respecto de las propiedades masivas. Esto puede conducir a que metales como Ag y Au cambien su comportamiento para dar aún una mayor amplificación o a que superficies que normalmente no califiquen como sustratos SERS, proporcionen amplificación si poseen algún tipo de nanoestructura. Por ejemplo, una superficie metálica rugosa posee estructuras en su superficie de dimensiones nanométricas y si las moléculas depositadas sobre ella están a una distancia adecuada, se puede observar la amplificación de sus señales. Además, se debe tener en cuenta que la relación superficie/volumen en los objetos nanométricos es considerablemente mayor respecto al material masivo, aumentando la cantidad potencial de moléculas que puedan dispersar la luz.

La mayor parte de las moléculas exhiben un espectro SERS muy similar al espectro Raman normal (para la misma longitud de onda de excitación). Sin embargo, pueden surgir algunas diferencias debido a que la resonancia de plasmones depende de la longitud de onda y las partes del espectro pueden ser amplificadas en diferentes proporciones. Incluso, la orientación de la molécula en la superficie puede inducir algún modo de simetría Raman particular. Así, todas las moléculas que son Raman activas pueden ser amplificadas por superficies, no obstante, algunas moléculas pueden ser “activadas” en ciertos modos al interactuar con el sustrato.

Los factores que promueven el SERS pueden clasificarse en amplificación debida al “campo electromagnético” y amplificación “química” o “de primera capa electrónica”. El factor de aumento electromagnético constituye la principal contribución y se debe al acoplamiento entre los campos electromagnéticos incidentes y Raman con el sustrato. Este aumento se debe a la resonancia de plasmones superficiales localizados, con lo cual las moléculas deben estar lo suficientemente próximas a la superficie (típicamente dentro de a lo sumo los 10 nm desde la superficie), por ejemplo, fisisorbidas o quimisorbidas.

La otra contribución se puede ver como una modificación en la polarizabilidad electrónica de la molécula, que puede inducir la dispersión Raman resonante (y por lo tanto aumentar las señales), por ejemplo por mecanismos de transferencia de carga. De este modo, la molécula debe estar químicamente adsorbida en la superficie (de ahí el nombre de amplificación química).

La intensidad final alcanzada en el espectro dependerá de la contribución de los diferentes factores de amplificación de acuerdo a la superficie empleada pero sobre todo estará limitada por la fortaleza de las señales Raman propias de la naturaleza de la molécula.

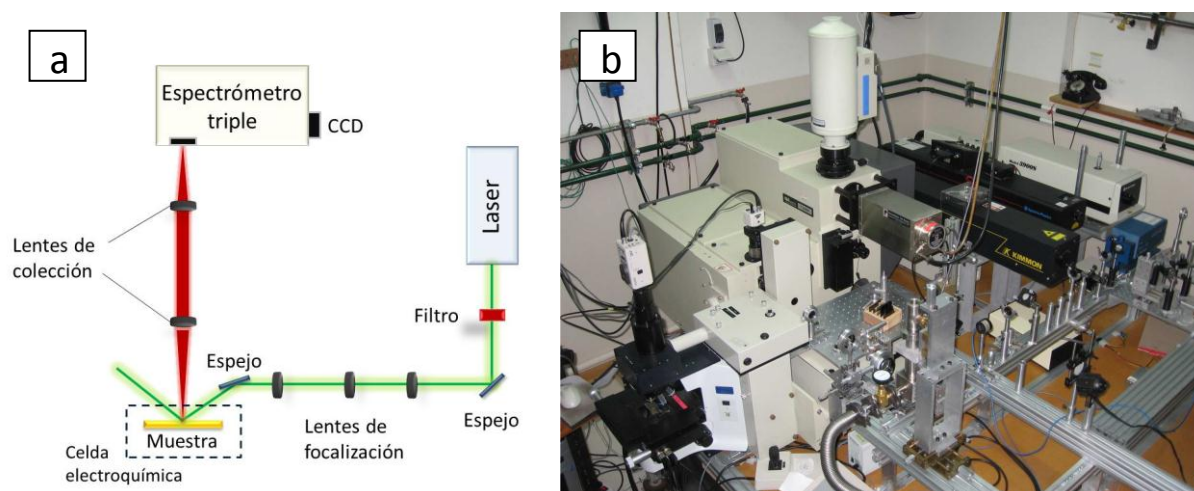
### 2.4.3 Arreglo experimental

Las mediciones Raman de este trabajo de Tesis se realizaron utilizando el equipo experimental que se muestra en la **Figura 2.33**, perteneciente al Laboratorio de Propiedades Ópticas de los Materiales (CAB-CNEA, Bariloche) a cargo del Dr. Alejandro Fainstein.

En este equipo, las fuentes de excitación pueden ser seleccionadas para cubrir diferentes regiones espectrales, un laser de Ti-Zafiro que permite sintonizar la longitud de onda  $\lambda$  de manera continua entre 690 y 1000 nm (IR cercano), otro de Ar-Kr con 16 líneas discretas ajustables,  $\lambda$  entre 450 y 676 nm (visible) y un tercero de He-Cd con una única línea a  $\lambda = 325$  nm (UV cercano).

El haz del laser se conduce mediante espejos y lentes hacia una lente de focalización que genera un spot de entre  $\sim 10$  y  $100 \mu\text{m}$  sobre la muestra. Otra lente, llamada de colección, toma la luz emitida o dispersada, para conducirla y focalizarla dentro del espectrómetro. Las excitaciones estudiadas por medio de espectroscopía Raman pueden ir desde un par de décimas de meV hasta algunos cientos meV, por ello los picos Raman

pueden estar muy próximos a la energía de la fuente. Por otra parte el pico de dispersión elástica puede ser 7 órdenes de magnitud mayor en intensidad que los picos Raman. El espectrómetro debe ser capaz de resolver espectralmente con buena precisión y además tener la capacidad de “filtrar” la luz espúrea (eliminar la dispersión elástica). Para ello, el espectrómetro Jobin-Yvon T64000, posee tres etapas de dispersión de luz y se lo puede usar de dos maneras. En modo aditivo, donde cada etapa en serie resuelve espectralmente y mejora la resolución, o en modo sustractivo, funcionando como un monocromador simple, pero donde las dos primeras etapas actúan como un filtro para el laser regulable en longitud de onda. Luego de que la luz es resuelta espectralmente, se colecta con una CCD (*charge couple device*) de alta resolución y bajo ruido electrónico (un electrón por hora), enfriada por N<sub>2</sub> líquido.



**Figura 2.33.** a) Esquema y b) fotografía del dispositivo experimental conformado por el espectrómetro triple Jobin-Yvon T64000 y los láseres de Ti-Zafiro, Ar-Kr y He-Cd utilizados para las mediciones de dispersión Raman.

Los espectros se tomaron tanto *ex situ* (al aire) como *in situ*. Las medidas *in situ* se llevaron a cabo enfocando el laser dentro de una celda electroquímica especialmente diseñada con ventanas ópticas, controlando el potencial mediante un potencióstato TeQ.

Todas las medidas así como el análisis de los espectros se realizaron con la colaboración y supervisión del Dr. Nicolás Tognalli (CAB-CNEA).

## 2.5 Balanza de Langmuir-Blodgett

La balanza de Langmuir-Blodgett (LB) es un aparato empleado para comprimir monocapas de moléculas en la superficie de una subfase dada (por ejemplo, agua) pudiéndose medir fenómenos superficiales relacionados con la compresión. También es posible emplear este equipo para depositar una o varias monocapas sobre sustratos sólidos.

Puede decirse que la observación de monocapas en la interfaz agua/aire se remonta a la época de los babilonios, quienes dispersaban gotas de aceite sobre una superficie de agua limpia para predecir el futuro, o bien a las notas de Aristóteles, quien describió “la dispersión de aceite sobre agua agitada”. El estudio metódico de estas monocapas tuvo sus inicios en 1774, con los trabajos de Benjamin Franklin, en los cuales menciona que una capa de aceite, de aparentemente sólo unos nanómetros de espesor, tenía un efecto calmante en el agua de los estanques de Clapham. Hacia fines del siglo XIX, una joven ama de casa alemana, Agnes Pockels, interesada en la física pero no pudiendo acceder a la educación universitaria diseñó la primera balanza de LB y llevó a cabo los experimentos en la cocina de su casa. En 1891, Pockels le escribió una carta a Lord Rayleigh, habiendo leído unos artículos publicados por él en *Naturwissenschaftliche Rundschau* donde mencionaba experimentos sobre la tensión superficial del agua, comentándole sus observaciones y describiéndole el equipo que modestamente había fabricado, ya que no se encontraba en posición de publicar sus avances:

*“Primero, le describiré un método simple, que he empleado por varios años, para aumentar o disminuir la superficie de un líquido en cualquier proporción, con el cual se puede alterar su pureza a voluntad.*

*Una cuba rectangular de hojalata de 70 cm de largo, 5 cm de ancho, 2 cm de altura, se llena con agua hasta el borde, y una tira de hojalata de unos 1 ½ cm reposa atravesando perpendicularmente su longitud, de modo que la parte inferior de la tira está en contacto con la superficie del agua, y la divide en dos mitades. Moviendo esta partición hacia la derecha o izquierda, la superficie de cada lado puede ser alargada o acortada en cualquier proporción, y la magnitud del desplazamiento puede ser leída en una escala sostenida a lo largo del frente de la cuba.*



*No tengo duda de que el aparato sufre, como le señalaré ahora, de cierta imperfección, ya que la partición nunca desconecta completamente las dos superficies separadas una de la otra. Si hay una gran diferencia de tensión entre los dos lados, una corriente de retorno traspasa la partición y el borde de la cuba (particularmente en el momento del cambio). El aparato, de todos modos, responde para conseguir cualquier condición de tensión la cual es por completo posible, y en experimentos con superficies muy limpias hay poco que temer con las corrientes que traspasan.*

*Siempre mido la tensión superficial en cualquier parte de la cuba como el peso necesario para separar de ella un pequeño disco (de 6 mm de diámetro) para lo cual uso una balanza liviana con brazos desiguales y un peso corredizo.”<sup>j</sup>*

Esta sencilla descripción puede perfectamente ajustarse al concepto de las balanzas LB modernas, las cuales operan bajos los mismos principios, aunque significativas modificaciones fueron implementándose de modo de minimizar inconvenientes y lograr medidas más precisas. En primer lugar, Lord Rayleigh implementó el método de Wilhelmy para medir la tensión superficial, montando una lámina delgada en la balanza, siendo su plano vertical y su borde horizontal inferior levemente sumergido en la superficie del agua.

Luego de varios reportes de Rayleigh y de Devaux y Hardy acerca de la naturaleza anfifílica de las moléculas que constituían estas monocapas, Irving Langmuir llevó a cabo los primeros estudios sistemáticos de monocapas de moléculas anfifílicas en la interfaz agua/aire. En 1917, publicó los conceptos teóricos y los métodos experimentales que prueban la importancia del estudio de estas monocapas, por lo que en su honor se denominan *películas de Langmuir*.

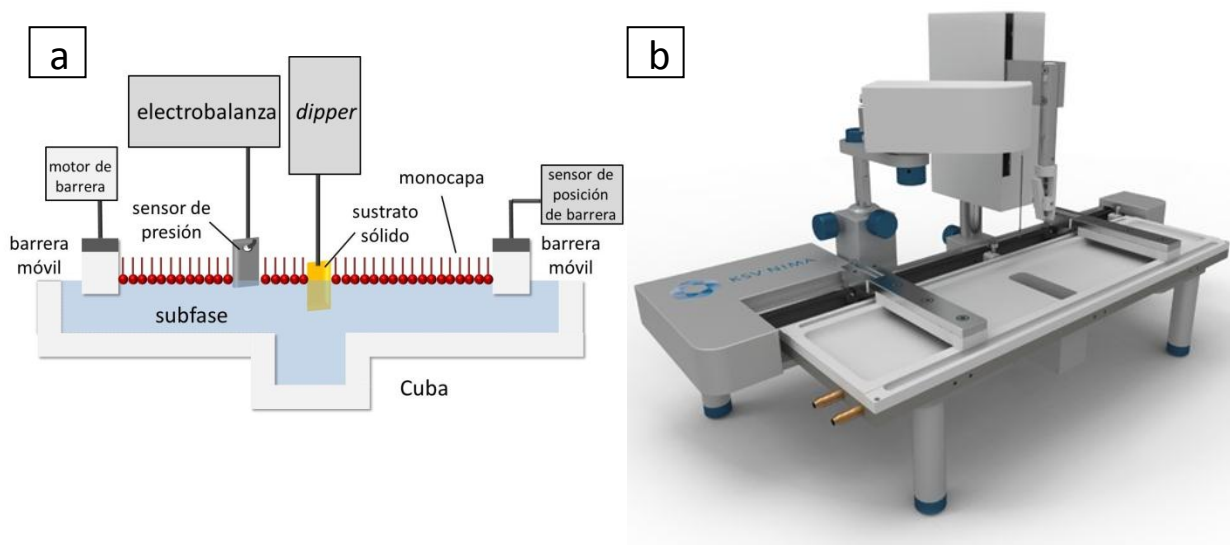
Posteriormente, una colaboradora de Langmuir, Katherine Blodgett, introdujo en 1934 la metodología para la deposición ordenada de una o varias capas de estas películas sobre sustratos sólidos, razón por la cual hoy en día se conoce este equipamiento como balanza de Langmuir-Blodgett.

Las balanzas de LB modernas están controladas por completo electrónicamente. Poseen una cuba recubierta de teflon, barreras móviles recubiertas de teflon controladas por un motor que permite un preciso control de la presión aplicada a la monocapa, un dispositivo de control que obtiene información del sensor de presión en la superficie del

---

<sup>j</sup> Extraído de la carta de Agnes Pockels a Lord Rayleigh publicada en *Nature* el 12 de marzo de 1891.

agua y regula la presión (electrobalanza) y un dispositivo para sumergir controladamente sustratos sólidos (*dipper*) (**Figura 2.34**). La incorporación del teflon, introducido por Fox y Zisman en 1955, facilita la limpieza de las superficies en contacto con la subfase, para obtener monocapas libres de contaminantes (otros surfactantes). Además se suele colocar la balanza de LB dentro de una cabina para lograr una atmósfera controlada y se emplea una mesa antivibratoria para evitar las oscilaciones en la superficie.



**Figura 2.34.** a) Esquema de las partes que constituyen una balanza moderna de Langmuir-Blodgett. b) Ilustración tridimensional de una balanza de la marca KSV NIMA modelo minitrough.

### 2.5.1 Películas de Langmuir

La principal clase de compuestos capaces de formar películas estables en la superficie del agua son aquellas conocidas como anfipáticas o anfifílicas. Las moléculas de estos compuestos poseen un grupo altamente polar, que es atraído por el agua, y una porción no polar suficientemente grande (generalmente una larga cola hidrofóbica) que impide la disolución de la monocapa en el agua. El grupo polar suele estar localizado en un extremo de la molécula de modo que las moléculas pueden alinearse paralelas una al lado de otra con la cola hidrofóbica sobresaliendo de la superficie del agua. Los materiales anfifílicos más simples son los ácidos alcanoicos de cadena larga, como el ácido esteárico, los cuales han sido ampliamente investigados. Otra clase de materiales muy caracterizada está

comprendida por biomoléculas constituyentes estructurales de las membranas biológicas como fosfolípidos y lipopolisacáridos.

Para formar las monocapas, el material se disuelve en un solvente orgánico volátil apropiado (por ejemplo, cloroformo) y se “siembra” sobre la superficie de la subfase acuosa dejando caer unas pocas gotas por medio de una jeringa Hamilton. El solvente se evapora en un periodo corto de tiempo y las moléculas se esparcen por toda la superficie del agua.

La formación de una monocapa anfifílica está relacionada con las propiedades termodinámicas particulares para la interfaz aire/líquido. La superficie de un líquido tiene un exceso de energía libre debido a la diferencia entre el entorno de las moléculas superficiales y aquellas que se encuentran en el seno del líquido (*bulk*). En el líquido, las moléculas poseen un cierto grado de atracción entre ellas, conocido como cohesión, el cual depende de la naturaleza del líquido. En el agua, diversas interacciones entre las que predominan los puentes de hidrógeno, forman redes tridimensionales que mantienen el balance de las fuerzas atractivas en todas las direcciones. Por otro lado, en la interfaz cada molécula sólo está en contacto con otras pocas moléculas y el balance resulta alterado, poseyendo una mayor atracción y tendiendo a disminuir espontáneamente el área expuesta. En estas condiciones, se debe realizar trabajo para extender la superficie de un líquido contra las fuerzas atractivas y consecuentemente se produce un aumento en la energía libre del sistema. Para que una interfaz esté en equilibrio, la velocidad de las moléculas que dejan la superficie para ir al *bulk* debe ser la misma de las que difunden del *bulk* hacia la superficie. La fuerza lineal que actúa en las moléculas superficiales se conoce como *tensión superficial*,  $\gamma$ , y se puede expresar como:

$$\gamma = \left( \frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T, P, n_i} \quad (2.14)$$

donde  $G$  es la energía libre de Gibbs y  $A$  es el área superficial a temperatura ( $T$ ), presión ( $P$ ) y número de componentes ( $n_i$ ) constantes. Las unidades habituales para la tensión superficial son [mN/m], que surgen de expresar la energía en [J] = [N.m] y el área superficial en [m<sup>2</sup>]. Los líquidos polares, como el agua, tienen fuertes interacciones intermoleculares y por lo tanto, altos valores de tensión superficial, siendo 72,8 mN/m a 20 °C y  $P_{\text{atm}}$ .

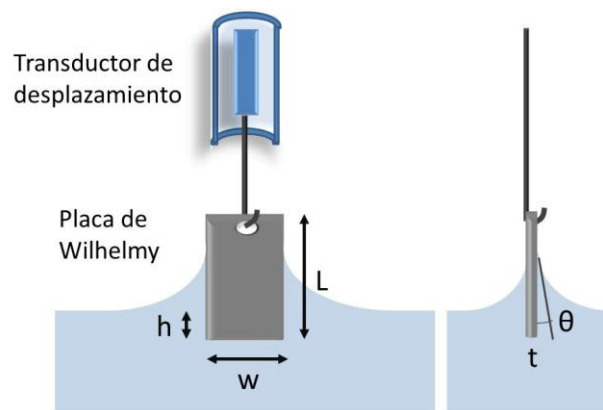
La formación espontánea de una monocapa cuando se coloca una sustancia anfifílica en la superficie de un líquido afectará el valor de  $\gamma$ . La tensión superficial puede ser vista como una presión negativa debido a las interacciones atractivas de las moléculas superficiales, que disminuirán por la acumulación de anfifilos en la interfaz aire/líquido. La presencia de la monocapa disminuye la energía libre del sistema debido a la creación de interacciones entre el grupo polar y el líquido, reduciendo consecuentemente la tensión superficial y produciendo una expansión de la interfaz aire/líquido.

Cuando el área superficial disponible es suficientemente grande y hay pocas moléculas surfactantes, la monocapa tiene un mínimo efecto en  $\gamma$ . Si la superficie disponible se reduce por medio de barreras móviles, la distancia entre los surfactantes disminuye así como también la tensión superficial. Cuando los anfifilos comienzan a interactuar ejercen un efecto repulsivo entre ellos y la fuerza ejercida por la película por unidad de área, correspondiente a un análogo bidimensional de la presión, se conoce como presión superficial ( $\pi$ ) y se expresa como:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2.15)$$

representando la reducción de la tensión superficial del líquido puro,  $\gamma_0$ , en presencia de la monocapa. La formación de una monocapa habitualmente se sigue registrando  $\pi$  en función del área a T constante (isotermas).

Para calcular  $\pi$  se puede recurrir al método de Wilhelmy que se basa en la medida absoluta de la fuerza debida a la tensión superficial en una placa, comúnmente una lámina de Pt o un filtro de papel, parcialmente sumergida en la subfase (**Figura 2.35**).



**Figura 2.35.** Esquema del método de la placa de Wilhelmy.

La medida primero se realiza con la superficie limpia y luego con la misma superficie cubierta por la monocapa. La variación debida a la alteración en  $\gamma$  es convertida en  $\pi$  teniendo en cuenta las dimensiones de la placa. A la fuerza de gravedad y a la tensión superficial se les contraponen la flotación debida al desplazamiento de agua. Para una placa rectangular de dimensiones  $L$ ,  $w$  y  $t$  (**Fig. 2.35**) de densidad  $\rho_p$ , sumergida a una profundidad  $h$  en un líquido de densidad  $\rho_l$ , la fuerza neta hacia abajo,  $F_0$ , en ausencia de la monocapa resulta:

$$F_0 = \rho_p g L w t + 2\gamma_0(t+w)\cos\theta_0 - \rho_l g t w h \quad (2.16)$$

donde  $\theta_0$  es el ángulo de contacto entre el líquido y la placa. Cuando la monocapa cubre la superficie, la expresión de la fuerza,  $F_m$ , cambia a:

$$F_m = \rho_p g L w t + 2\gamma(t+w)\cos\theta_m - \rho_l g t w h \quad (2.17)$$

siendo  $\theta_m$  el ángulo de contacto entre el líquido cubierto por la monocapa y la placa. Si la placa se mantiene estacionaria ( $h$  es constante), el cambio en la fuerza está relacionado con el cambio en presión superficial:

$$\Delta F = F_m - F_0 = 2(t+w)(\gamma_0\cos\theta_0 - \gamma_m\cos\theta_m) \quad (2.18)$$

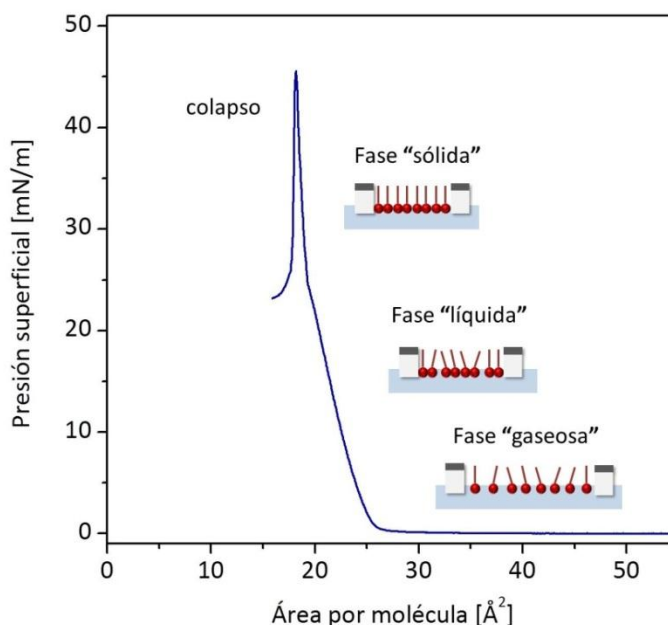
Si la placa es lo suficientemente delgada ( $t \ll w$ ) y los ángulos de contacto se igualan a cero, por ejemplo manteniendo la placa mojada por completo, el cambio en la fuerza se puede expresar como:

$$\Delta F = 2w(\gamma_m - \gamma_0) = 2w\pi \quad (2.19)$$

El cambio en la fuerza se sigue con la electrobalanza y el equipo lo transforma en  $\pi$  cuando se informa el ancho de la placa empleada.

Las isothermas de  $\pi$  en función del área se miden en condiciones de pseudo-equilibrio por compresión continua de la monocapa mientras se registra la presión superficial. En un experimento típico, los anfífilos inicialmente están lo suficientemente alejados entre sí sobre la superficie del agua, de modo que hay muy poca interacción. Esta condición puede ser considerada como un “gas” bidimensional debido a la gran distancia entre moléculas (fase “gaseosa”, **Figura 2.36**), que tienen poco efecto sobre la energía libre de la subfase, por lo

tanto  $\gamma$  no sufre cambios y  $\pi$  es muy baja ( $< 1 \text{ mN/m}$ ). Esta situación se mantiene hasta que el movimiento de las barreras aproxima los anfífilos hasta un punto en que comienzan a interactuar y  $\pi$  aumenta (punto de despegue), entrando a las fases “líquidas”.



**Figura 2.36.** Isotherma  $\pi$ -A de ácido esteárico sobre agua MilliQ a 23 °C. Se indican esquemáticamente las fases y el punto de colapso.

Durante la compresión de la monocapa, los anfífilos se autoorganizan y pueden sufrir distintas transformaciones de fase, que se pueden identificar como discontinuidades en la isoterma. Estas fases corresponden a diferentes organizaciones moleculares, en donde las cadenas hidrofóbicas presentan distintos arreglos. En las fases más condensadas existe una fuerte cohesión lateral alcanzándose el empaquetamiento compacto. Las cadenas hidrocarbonadas se orientan uniformemente, razón por la cual se lo puede considerar un “sólido” bidimensional.

Finalmente, si se le aplica una mayor compresión ocurre el fenómeno de colapso de la monocapa por inestabilidad mecánica, expulsando moléculas de la interfaz con la formación de multicapas desordenadas, lo cual se puede observar como una caída abrupta de la presión superficial (**Fig 2.36**).

Debido a que los anfífilos son prácticamente insolubles en la subfase (las solubilidades son del orden de  $10^{-12} - 10^{-10} \text{ M}$ ), la cantidad de moléculas permanece

constante durante la compresión. De este modo, es posible calcular el *área por molécula* (área promedio disponible por cada molécula) dividiendo el área de la monocapa determinada por la posición de las barreras por el total de moléculas “sembradas” en la superficie (teniendo en cuenta el volumen y la concentración del anfifilo). Las isothermas se muestran comúnmente expresadas en función del área por molécula en [ $\text{\AA}^2/\text{molec}$ ] o [ $\text{nm}^2/\text{molec}$ ].

Las fases características con las que se puede describir una isoterma están determinadas principalmente por la naturaleza del anfifilo, de acuerdo al tamaño y grado de polaridad de la cabeza hidrofílica y al largo y disposición de las cadenas hidrocarbonadas. Además, la subfase puede influenciar el orden de acuerdo a su composición (pH, concentración de iones, presencia de quelantes, etc.). La temperatura tiene un rol trascendental ya que variaciones muy pequeñas pueden modificar las fases. Las temperaturas bajas tienden a fomentar el orden, favoreciendo la extensión de las fases condensadas, mientras que el aumento de temperatura favorecerá el desorden en las monocapas. De manera general, las isothermas  $\pi$ -A proveen información de la estabilidad de la monocapa en la interfaz aire/líquido, la reorientación de las moléculas en el sistema bidimensional y la existencia de transiciones de fase y transformaciones conformacionales.

### 2.5.2 Deposición de películas por la técnica de Langmuir-Blodgett

Para que una película pueda ser transferida a un sustrato sólido, se deben investigar un cierto número de características de modo de establecer si se tratará de una película de Langmuir-Blodgett o simplemente una muestra preparada utilizando el método de transferencia de Langmuir-Blodgett.

Uno de los pre-requisitos es la estabilidad de la monocapa de modo de conservar la calidad estructural en la transferencia. Esta estabilidad depende principalmente de la disolución de la monocapa en la subfase y de la estabilidad mecánica respecto de la sobrecompresión. Debido a que la monocapa flotante es más bien un sistema metaestable que un sistema en equilibrio absoluto, se puede perder su integridad si ésta no es cuidadosamente manipulada. En algunos casos, se puede incrementar considerablemente la

estabilidad de la monocapa mediante la adición de iones multivalentes o bien por modificación del pH de la subfase.

En la mayor parte de los casos, la monocapa no es completamente estable después de la compresión hasta la presión superficial deseada, logrando estabilizarse recién después de un cierto tiempo. De un modo general, la estabilidad de la monocapa puede ser supervisada ya sea midiendo el descenso de  $\pi$  cuando el área se mantiene constante o bien registrando la disminución del área de la película cuando se mantiene  $\pi$  constante.

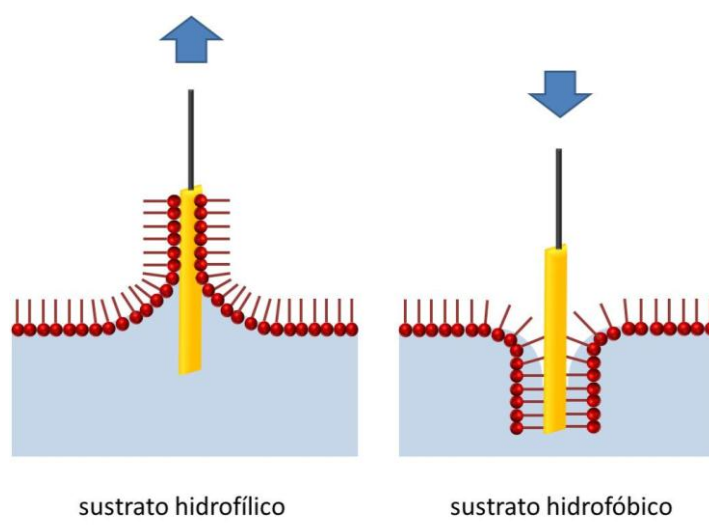
Otro método para verificar la estabilidad de la monocapa es el ciclado dinámico de las isothermas  $\pi$ -A, también llamados experimentos de histéresis. En un experimento de este tipo, la monocapa es sucesivamente comprimida a una presión superficial fija y luego, se relaja al estado original. Algunos fenómenos de histéresis durante el primer ciclo de compresión/descompresión se pueden observar normalmente, aún para monocapas estables. Estos fenómenos se deben a la diferencia de los procesos de formación de dominios que ocurren durante la agregación (organización de las moléculas en la compresión) y la relajación (desorganización de las moléculas durante la descompresión).

Cuando la presión superficial es la suficientemente alta para asegurar una cohesión lateral en la película interfacial, la monocapa flotante puede ser transferida desde la superficie de la subfase hacia un sustrato sólido. Existen distintos modos de alcanzar este objetivo, sin embargo, en esta sección se comentará únicamente la técnica de Langmuir-Blodgett, que involucra el movimiento vertical del sustrato sólido a través de la interfaz monocapa/aire.

Dependiendo de la naturaleza de sustrato, la primera monocapa puede ser transferida por inmersión (sustrato hidrofóbico) o por emersión (sustrato hidrofílico) (**Figura 2.37**). En el caso de la emersión, se debe sumergir el sustrato en la subfase previamente a la formación de la monocapa, interaccionando mediante los grupos polares. Caso contrario, en la inmersión se forma previamente la monocapa y el sustrato desciende atravesándola, interaccionando con las colas hidrofóbicas.

Para depositar las películas, las balanzas modernas poseen un circuito de retroalimentación que controla la posición de las barreras compensando los cambios de modo que la presión superficial sea mantenida constante durante la transferencia. Además es conveniente alcanzar el valor de  $\pi$  lentamente para evitar fenómenos de sobrecompresión.





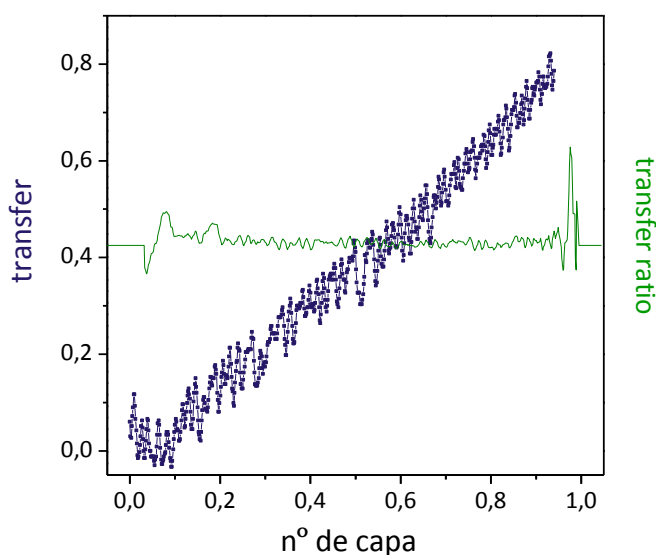
**Figura 2.37.** Esquemas de transferencia según la técnica de Langmuir-Blodgett para un sustrato hidrofílico y uno hidrofóbico.

Un punto que debe ser remarcado y que influye en el éxito de la transferencia es el valor del ángulo de contacto dinámico entre el líquido cubierto por la monocapa y el sustrato (menisco). Para la deposición por inmersión se requiere la formación de ángulos de contacto obtusos ( $> 90^\circ$ ) mientras que para la emersión deben ser agudos ( $< 90^\circ$ ), de lo contrario no se adsorben las capas sobre el sustrato. La forma del menisco está relacionada con la tensión superficial y se debe tener en cuenta que en esa zona las condiciones de equilibrio difieren a las de la interfaz agua/aire, pudiendo ocurrir las transiciones de fase a valores distintos.

Relacionado con este último punto, la elección de la velocidad de transferencia estará limitada no sólo por la cohesión lateral de la monocapa sino también por la interacción de la misma con el sustrato. Típicamente se emplean velocidades de pocos mm/min.

La transferencia de la monocapa al sustrato se suele caracterizar por el cociente de transferencia (*transfer ratio*). El movimiento de compensación de las barreras para mantener la presión superficial constante se emplea como indicador de la calidad de la transferencia (**Figura 2.38**). El cociente de transferencia se define como la disminución en el área ocupada por la monocapa en la superficie de la subfase dividido por el área cubierta en sustrato sólido, siendo 1 el valor óptimo. Valores cercanos a la unidad se utilizan como criterio para

determinar una buena transferencia y en estas circunstancias se esperaría que la orientación de las moléculas sea similar a la hallada en la interfaz líquido/aire. Sin embargo, como se discutió anteriormente, esto no es necesariamente cierto y se deben realizar caracterizaciones adicionales mediante otras técnicas para verificar la calidad de la monocapa transferida.



**Figura 2.38.** Gráfico de transferencia de una monocapa por inmersión. Se puede observar al principio y al final ciertas irregularidades debido al contacto inicial del sustrato con la interfaz y luego de la inmersión total.

### 2.5.3 Arreglo experimental

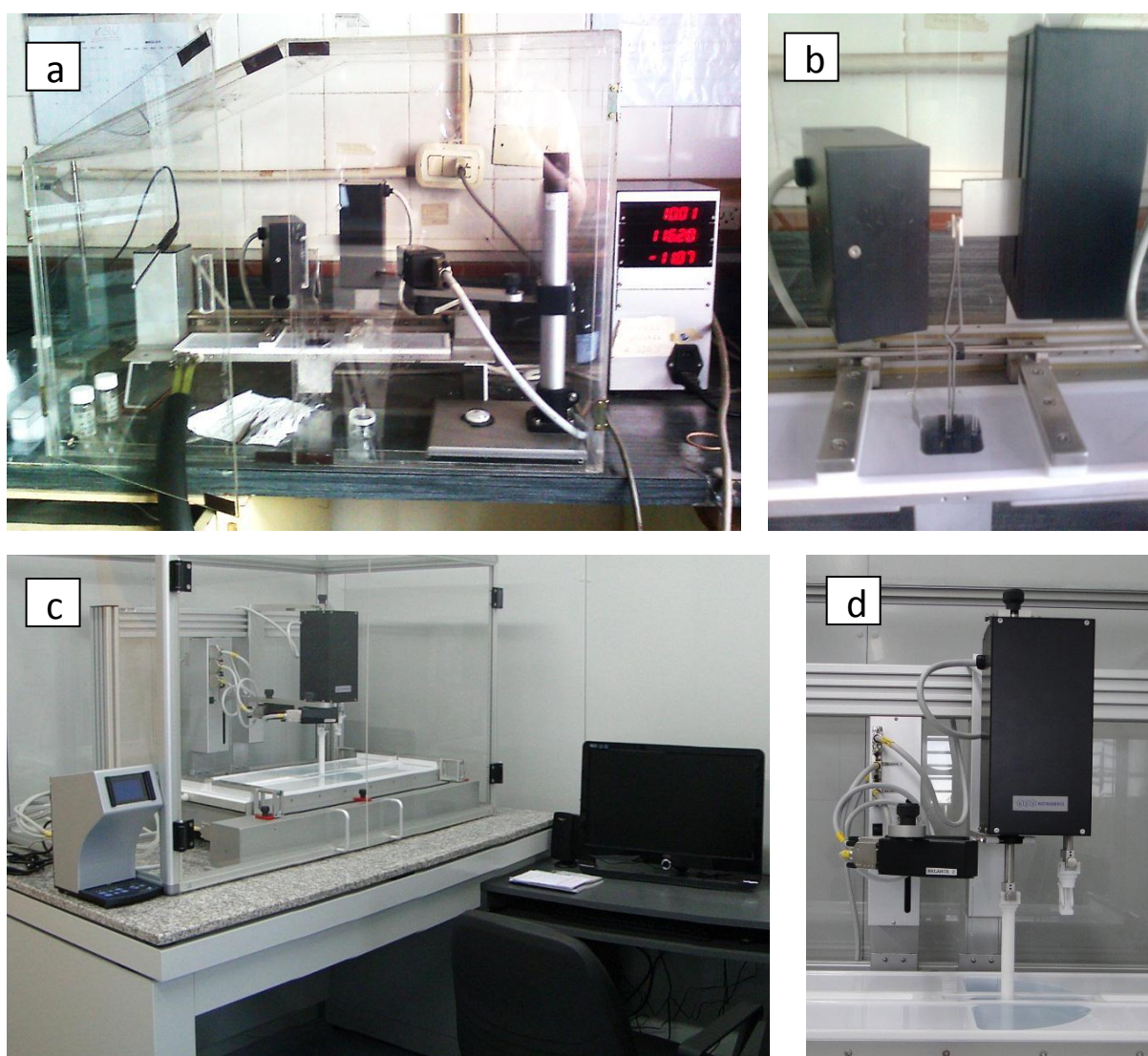
Las medidas con balanza de Langmuir-Blodgett se realizaron con equipos de la firma KSV NIMA pertenecientes al CIQUIBIC-UNC y al INIFTA. Se realizaron isoterms  $\pi$ -A para temperaturas entre 10 y 35 °C y transferencia de monocapas por inmersión. Dichos experimentos se describirán en el Capítulo 6.

Las balanzas empleadas poseen cubas de teflon y la  $\pi$  se mide mediante el método de Wilhelmy, utilizando una placa de Pt de dimensiones conocidas provista por KSV. Para asegurar su limpieza se procedió a un flameo con mechero de gas natural durante unos segundos previamente a la colocación en el soporte colgante de la balanza.

Las subfases siempre fueron soluciones acuosas o bien agua MilliQ y se aseguró su limpieza (ausencia de contaminación por surfactantes) midiendo la  $\pi$  superficial y aspirando

material de la interfaz mediante una bomba, la cual para tales fines posee una manguera con un *tip* plástico en el extremo. El control de temperatura se llevó a cabo mediante la conexión de la cuba a un baño termostático, el cual se dejó estabilizar previamente a la formación de las monocapas.

Las balanzas se encuentran dentro de una cabina especialmente diseñada para evitar la contaminación de la superficie (**Figura 2.39 a, c**) y están soportadas sobre una mesa aislada de vibraciones.



**Figura 2.39.** Balanzas de LB a) modelo KSV minitrough y b) sistema de *dipping* (perteneciente al CIQUIBIC). c) Modelo KSV 5000 y d) detalle del sistema de *dipping* (perteneciente al INIFTA).

La transferencia de monocapas se realizó mediante el sistema de *dipping* de las balanzas LB (**Figura 2.39 b, d**). Para ello, a los sustratos de oro empleados se les soldó un alambre de oro por el cual se los sujetó a la pinza solidaria al motor de *dipping*. Luego de la transferencia, los sustratos caen sobre recipientes individuales especialmente fabricados, los cuales se colocan en el espacio central de la cuba previamente a la formación de la monocapa. Así, se pudieron retirar los sustratos luego de la inmersión sin que abandonaran la fase líquida.

El control de los parámetros para los experimentos de isotermas y de transferencia, así como el análisis de los datos obtenidos, se realizaron con el programa LayerBuilder provisto por el fabricante (KSV NIMA).

Todas las medidas fueron realizadas con la colaboración del Dr. Rafael Oliveira y la Dra. Natalia Wilke, ambos investigadores del CIQUIBIC-UNC. A su vez, las medidas realizadas en el INIFTA con el equipo perteneciente al grupo SUNSET (Estudios de Superficies y Nanopartículas basados en el empleo de Luz Sincrotron) contaron con la colaboración de la Dra. Cecilia dos Santos Claro.

## 2.6 Bibliografía

### 2.6.1 Métodos electroquímicos

- \* Adamson, A. W.; Gast, A. P. (1997) *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th ed., John Wiley & Sons, New York.
- \* Bockris, J. O'M.; Reddy, A. K. N. (1998) *Modern Electrochemistry*, Vol. 1 & 2, 2nd ed., Plenum Press, New York.
- \* Bard, A. J.; Faulkner, L. R. (2001) *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.

### 2.6.2 Microscopías de barrido por sondas

- \* Adamson, A. W.; Gast, A. P. (1997) *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th ed., John Wiley & Sons, New York.
- \* Wiesendanger, R.; Gütherodt, H.-J. (1994) *Scanning Tunneling Microscopy I*, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin.
- \* Magonov, S. N.; Whangbo, M.-H. (1996) *Surface Analysis with STM and AFM: Experimental and Theoretical Aspects of Image Analysis*, VCH Publishers Inc., Weinheim
- \* Bonnell, D. (2000) *Probe Microscopy and Spectroscopy: Theory, Techniques and Applications*, John Wiley & Sons, New York.

- \* Wang, Z. L.; Yao, N. (2005) *Handbook of Microscopy for Nanotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Boston.
- \* Eaton, P.; West, P. (2010) *Atomic Force Microscopy*, Oxford University Press, New York.
- \* Manuales Nanoscope v 4.22 – v 6.13 de Digital Instruments Inc.

### 2.6.3 Espectroscopía de fotoelectrones por rayos X (XPS)

- \* Feldman, L. C.; Mayer, J. W. (1986) *Fundamentals of surface and thin film analysis*, Nort-Holland, New York.
- \* Briggs, D.; Seah, M. P. (1990) *Practical Surface Analysis, Vol. 1 Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
- \* Manual CasaXPS 2.3.15 Rev 1.2 (2009) Casa Software Ltd.

### 2.6.4 Espectroscopía Raman amplificada por superficies (SERS)

- \* Ferraro, J. R.; Nakamoto, K.; Brown, C. W. (2003) *Introductory Raman Spectroscopy*, 2nd ed., Elsevier Inc., New York.
- \* Smith, E.; Dent, G. (2005) *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- \* Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. (2009) *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*, 1st ed., Elsevier Inc., Oxford.

### 2.6.5 Balanza de Langmuir-Blodgett

- \* Adamson, A. W.; Gast, A. P. (1997) *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th ed., John Wiley & Sons, New York.
- \* Roberts, G. G. (1990) *Langmuir-Blodgett films*, Plenum Press, New York.
- \* Peterson, I. R. (1990) Langmuir-Blodgett films, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 23, 379-395.
- \* Ulman, A. (1991) *An introduction to Ultrathin Organic Films: from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press Inc., San Diego.
- \* Oliveira, O. N. J. (1992) Langmuir-Blodgett Films - Properties and Possible Applications, *Brazilian Journal of Physics* 22, 60-69.
- \* Petty, M. C. (1996) *Langmuir-Blodgett films - An introduction*, Cambridge University Press, Cambridge.
- \* Girard-Egrot, A. P.; Blum, L. J. (2007) Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes, in *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes* (Martin, D. K., Ed.), Springer, New York.

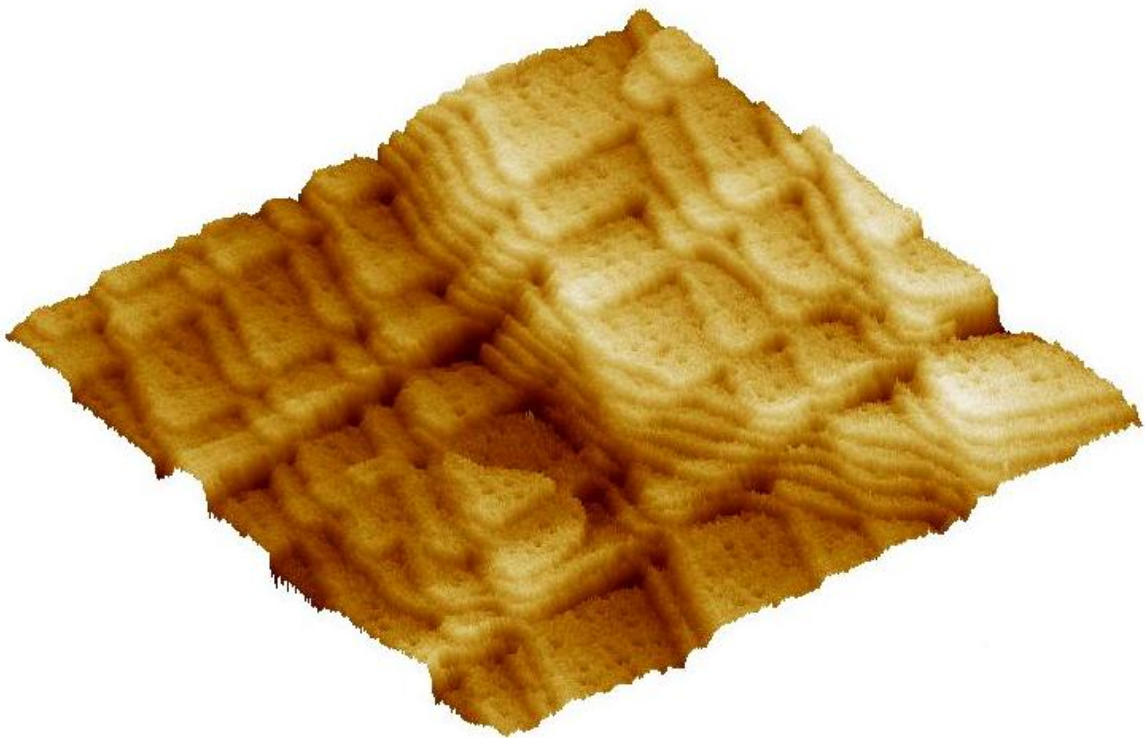
# Capítulo 3

## Autoensamblado de alcanotioles y $\alpha,\omega$ -alcanoditioles sobre oro

Se describen la estructura y formación de monocapas autoensambladas de alcanotioles y  $\alpha,\omega$ -alcanoditioles así como la calidad final alcanzada respecto a sus propiedades de barrera y grupos terminales expuestos.

*“Si cada instrumento pudiera cumplir su propia tarea, al recibir una orden o al anticiparse a ella [...] los artesanos no tendrían necesidad de aprendices ni los amos de esclavos.”*

Aristóteles



*“Build me up buttercup”*

The Foundations (1968)

### 3.1 Introducción

La autoorganización es un término que describe al conjunto de procesos por los cuales un sistema desordenado que contiene componentes preexistentes forma una estructura organizada como resultado de las interacciones locales entre estos componentes. Contrario a lo esperado, este mayor orden resulta en una reducción de la energía libre del sistema, como consecuencia de la disminución del área expuesta por cada componente. Por lo tanto, una de las principales características de la autoorganización es la espontaneidad del proceso. Otra característica importante es que está impulsada por múltiples interacciones débiles y reversibles. El bajo costo energético implicado y la velocidad a la que ocurre este fenómeno lo convierten en uno de los recursos más empleados por la naturaleza para la construcción de macroestructuras como en la formación de membranas biológicas, para el reconocimiento entre cadenas de DNA o DNA-mRNA y para el plegamiento de proteínas.<sup>[1]</sup>

La formación de monocapas por autoorganización y autoensamblado es hoy en día una de las rutas más empleadas para modificar superficies. Los metales en particular tienden a adsorber material orgánico del ambiente circundante ya que estos adsorbatos disminuyen la energía libre de la interfaz entre la superficie metálica y el ambiente.<sup>[2]</sup> Si bien cualquier adsorbato tiene la capacidad de alterar las propiedades interfaciales (conductividad, humectabilidad, resistencia a la corrosión, etc.), solamente las unidades moleculares con una estructura química específica son capaces de formar monocapas autoensambladas o SAMs (por su acrónimo en inglés, *self-assembled monolayers*). Las estructuras formadas por autoensamblado están en equilibrio termodinámico, o cercano a él, por lo tanto tienden a reparar sus defectos y constituyen arreglos estables y ordenados.

Los primeros trabajos que demuestran la formación de capas monomoleculares autoensambladas fueron llevados a cabo a mediados de la década del '40 por Zisman *et al.*,<sup>[3]</sup> adsorbiendo alquilaminas sobre una superficie de Pt limpia. Pero el gran despegue en esta área comenzó recién en la década de los '80 cuando Nuzzo y Allara prepararon SAMs de alcanotiolatos sobre oro policristalino por adsorción de di-*n*-alquildisulfuros desde soluciones diluidas.<sup>[4]</sup> El éxito de sus experimentos se debió a dos factores importantes: la estabilidad de los alcanotioles y el uso de una superficie inerte. De este modo se logró instaurar un nuevo tipo de modificación superficial muy simple y flexible que permite acoplar un sustrato inorgánico con el diseño orgánico funcional que se desea exponer al



medio circundante. En particular en el área de biosensores son un valioso nexo entre el conductor metálico encargado de transducir señales y las moléculas biológicas que sirven como elementos de reconocimiento. Pero su rango de aplicación es mucho más amplio abarcando diversos tópicos como micro y nanofabricación, electrónica molecular, resistencia a la corrosión, reducción de fricción y adherencia, entre muchas otras.

### 3.1.1 SAMs de alcanotioles sobre oro

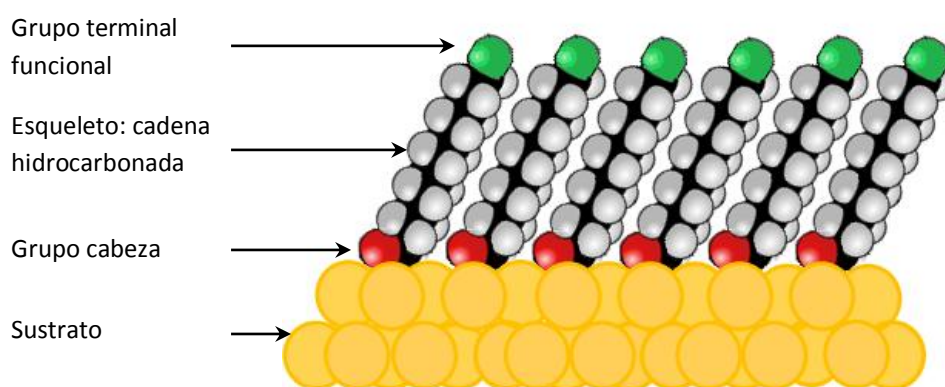
Existen numerosas variantes de monocapas autoensambladas sobre sustratos inorgánicos dependiendo de la combinación entre bloque molecular y tipo de superficie (**Tabla 3.1**).<sup>[5]</sup> Entre ellas, las SAMs de alcanotioles sobre oro han sido y son las más estudiadas, debido a la simplicidad de su preparación y a que aún resta dilucidar varios aspectos concernientes a su formación y estructura, que luego se pueden trasladar a sistemas más complejos. Haremos entonces un resumen del conocimiento asentado que se tiene hasta el día de la fecha.

**Tabla 3.1.** Tipos de SAMs reportadas en la literatura

Ligando	Sustratos	
Alcanotioles	Au	Cu, Pt, Pd, Hg, Ni, Ru, Zn, Ge GaAs, CdS, CdSe, CdTe, ZnS, ZnSe
Dialquildisulfuros		CdS, CdSe, CdTe
Dialquilsulfuros		
Alquilxantatos		
Dialquiltiocarbamatos		
Alcanoseleniuros		CdS, CdSe
Dialquildiseleniuros		
Alcanonitrilos		
Alquifosfuros		CdS, CdSe, CdTe
Alquifosfatos		TiO <sub>2</sub> , Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Alquilaminas	Ag	Mica CdSe
Alquilalcoholes		Fe <sub>x</sub> O <sub>y</sub> Si, Si-H
Ácidos carboxílicos		AgO, Ti/TiO <sub>2</sub> , Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Fe <sub>x</sub> O <sub>y</sub>
Alquilsilanos		SiO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> , ZrO <sub>2</sub> , HfO <sub>2</sub> , ITO

Si hacemos un esquema de una SAM ideal (**Figura 3.1**), podemos describirla dividiéndola en tres secciones:

- *Grupo cabeza o ligando*: tiene una alta afinidad por el sustrato y estabiliza la superficie.
- *Esqueleto o espaciador*: cadena hidrocarbonada, provee un espesor definido, actúa como una barrera física y altera la conductividad electrónica.
- *Grupo funcional terminal*: distintos grupos químicos, determinan las propiedades superficiales.



**Figura 3.1.** Esquema de una SAM soportada en una superficie con orientación (111).

El grupo terminal contiene una función química (por ej.  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$ ) que determina la naturaleza de la superficie expuesta al ambiente. Sobre este grupo es posible unir distintas moléculas a través de un enlace covalente mediante agentes acoplantes o bien adsorberlas por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o puentes de H, actuando como elementos básicos para la construcción de estructuras moleculares más complejas.

Las SAMs se pueden preparar desde fase vapor o a partir de soluciones. La formación por adsorción desde fase gaseosa permite una dosificación muy controlada del material que llega a la superficie, sin embargo, implica que el alcanotiol tenga una presión de vapor lo suficientemente alta. El método más ampliamente utilizado es la preparación de SAMs desde soluciones, para la cual se disuelve el alcanotiol en un solvente adecuado y se sumerge el sustrato por un tiempo determinado, según la concentración de alcanotiol empleada.

Diversos tipos de experimentos (cuyas técnicas empleadas están enumeradas en la **Tabla 5.2**) han permitido establecer las características estructurales básicas (estructura superficial, organización de las cadenas hidrocarbonadas, orientación de las cadenas), protocolos de preparación adecuados (limpieza del sustrato, pureza del adsorbato, concentración del adsorbato, tiempo de incubación, tipo de solvente, temperatura, luz y atmósfera) y parte de la termodinámica y cinética que gobiernan los procesos de autoorganización y autoensamblado.

**Tabla 5.2.** Técnicas empleadas para el estudio de SAMs.

<b>Técnica</b>	<b>Acrónimo en inglés</b>
Microscopía de Fuerzas Atómicas	AFM
Microscopía de Efecto Túnel	STM
Microscopía de Trasmisión de Electrones y con Alta Resolución	TEM & HR-TEM
Ángulo de contacto	
Elipsometría óptica	
Microbalanza Electroquímica de Cristal de Cuarzo	EQCM
Voltamperometría Cíclica	CV
Espectroscopía de Impedancia Electroquímica	EIS
Espectroscopía Infrarroja e Infrarroja con Transformada de Fourier	IR & FTIR
Espectroscopía Infrarroja de Reflexión-Absorción y con Modulación de la Polarización	IRRAS & PM-IRRAS
Espectroscopía Raman Amplificada por Superficies	SERS
Espectroscopía de Generación de Suma de Frecuencias	SFG
Espectroscopía de Generación de Segundos Armónicos	SHG
Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear en Estado Sólido	SS-NMR
Resonancia de Plasmones Superficiales	SPR
Desorción a Temperatura Programada	TPD
Espectroscopía de Electrones Auger	AES
Espectroscopía de Alta Resolución de Pérdidas de Energía de Electrones	HREELS
Espectroscopía de Dispersión de Iones	ISS
Espectroscopía de Retroceso Directo con Tiempo de Vuelo	TOF-DRS
Espectroscopía de Fotoelectrones por Ultravioleta	UPS
Espectroscopía de Fotoelectrones por Rayos X	XPS
Estructura Fina de la Absorción de Rayos X	EXAFS
Estructura del Borde Cercano de la Absorción de Rayos X	XANES
Difracción de Rayos X con Incidencia Rasante	GIXD
Difracción de Electrones de Baja Energía	LEED
Difracción de Fotoelectrones por Rayos X	XPD
Difracción de Rayos X	XRD
Ondas Estacionarias de Rayos X	XSW
Teoría del Funcional de la Densidad	DFT
Dinámica Molecular	MD

El cubrimiento de la superficie depende de las propiedades del sustrato, tales como la reactividad, la energía superficial y la estructura. La unión tiolato-Au tiene una energía de aproximadamente 50 kcal/mol<sup>[5]</sup> y se lo puede describir como covalente polar. Esta fortaleza de enlace brinda una gran ventaja con respecto a otros sistemas ya que es posible hacer modificaciones posteriores a través del grupo funcional sin afectar la estabilidad de la SAM. La quimisorción del alcanotiol sobre oro se puede describir mediante la ecuación (3.1):



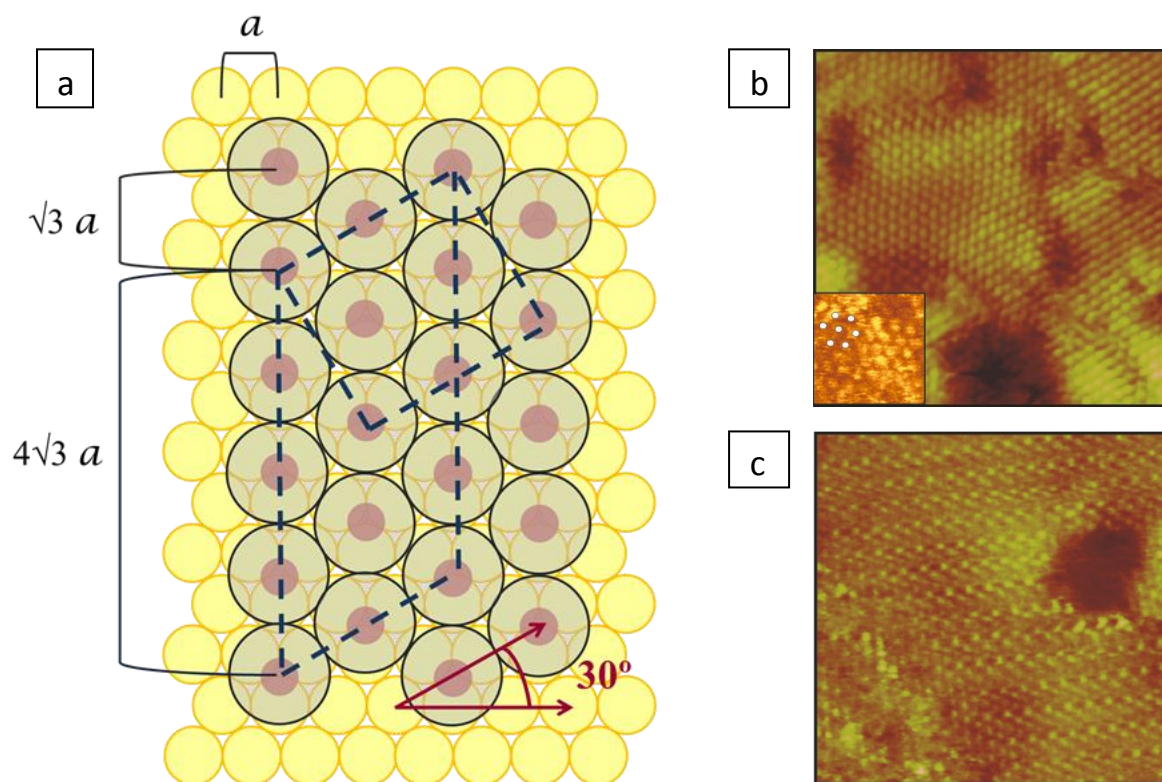
Si bien el mecanismo de reacción no es del todo comprendido, la misma se considera formalmente como una adición oxidativa del enlace S-H sobre la superficie de oro, seguida de una eliminación reductiva del hidrógeno. A través de medidas de XPS, se puede establecer el estado de oxidación del S revelando la formación de tiolato de oro para la formación de SAMs tanto desde fase vapor como a partir de soluciones. No obstante, el destino del H puede ser distinto dependiendo de la limpieza de la superficie y el entorno químico. Probablemente, en una superficie limpia y en ausencia de oxígeno, se elimine como H<sub>2</sub>.<sup>[6]</sup>

Los grupos -SH se unen a la superficie del Au(111) en sitios específicos formando arreglos que son conmensurados con el sustrato (**Figura 3.2**): la red  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° y estructuras relacionadas c(4 x 2). Ambas redes han sido caracterizadas a través de medidas de STM y GIXD,<sup>[7]</sup> en condiciones de saturación de moléculas en la superficie.

Las redes formadas son hexagonales (**Fig. 3.2b**) al igual que la superficie del Au(111), y la distancia entre átomos de S es  $\sqrt{3}$  veces mayor ( $d = 4,995 \text{ \AA}$ ) a la distancia entre átomos de Au ( $d = 2,884 \text{ \AA}$ ), dando un cubrimiento  $\theta = 1/3$  correspondiente al empaquetamiento compacto generado por las cadenas hidrocarbonadas. Además, la red de los alcanotioles está rotada 30° respecto de la red del oro, de ahí la denominación  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30°. Las super-redes (**Fig. 3.2c**) se originan debido a las diferentes orientaciones y/o alturas de los grupos metilo terminales y a la reestructuración de la superficie de oro.<sup>[8]</sup>

A partir del análisis de modos vibracionales de estiramiento de -CH<sub>2</sub> y -CH<sub>3</sub> mediante espectroscopías infrarrojas, se puede decir que las cadenas hidrocarbonadas tienden a acomodarse en configuración *trans* con pocos defectos *gauche* de manera tal que maximizan las interacciones de van der Waals.<sup>[8]</sup> Para ello se ubican a un ángulo de inclinación respecto de la vertical de entre 30 y 35° como se muestra en la **Fig. 3.1**. Cabe

destacar que si bien en el esquema de la **Fig. 3.2** se ubicaron los átomos de S en sitios hueco de la red de oro, no necesariamente es ésta la posición que adoptan. Los cálculos de DFT muestran que la superficie posee distintos mínimos energéticos para la adsorción de tioles y además se debe tener en cuenta la reconstrucción que sufre la superficie de oro.<sup>[8, 9]</sup>



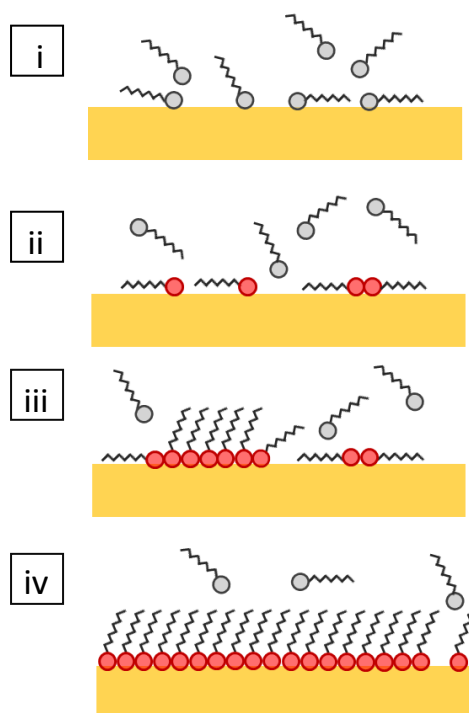
**Figura 3.2.** a) Modelo estructural de la SAM de tioles sobre la red de oro. El arreglo muestra la red  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° donde los átomos de azufre (círculos rojos) están ubicados en los huecos de la red de oro (círculos amarillos,  $a = 2,884 \text{ \AA}$ ). Los círculos negros son las proyecciones de las cadenas hidrocarbonadas. Están denotadas con líneas punteadas las celdas unidad de  $c(4 \times 2)$  y  $2 \times \sqrt{3} \times \sqrt{3}$ . b) Imágenes de STM de  $13,5 \text{ nm} \times 13,5 \text{ nm}$  de la red  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° en una SAM de decanotiol y c) la super-red  $c(4 \times 2)$  rectangular en una SAM de hexanotiol ambas sobre Au(111).

La forma más simple de describir el proceso de ensamblado de alcanotioles sobre oro es resumirlo en una serie de etapas (**Figura 3.3**). El paso inicial implica la fisisorción de las moléculas, seguidas por la quimisorción, con las moléculas en configuración paralela a la superficie del sustrato formando dominios ordenados. Luego, al agregar más moléculas, ocurre una transición paralela-vertical en la configuración de las moléculas y finalmente la corrección de defectos en esta fase densa y vertical. Esta configuración maximiza el número de interacciones laterales ( $1 \text{ kcal/C}$ ). Si bien es difícil obtener información del intermediario fisisorbido, es posible hacer una cuantificación indirecta a través de la diferencia entre el recubrimiento total de la superficie y la cantidad de especies quimisorbidas.<sup>[9]</sup> Por lo tanto,

no podemos describir el proceso de adsorción simplemente con la ecuación (3.1), sino mediante las reacciones (3.2a) y (3.2b):



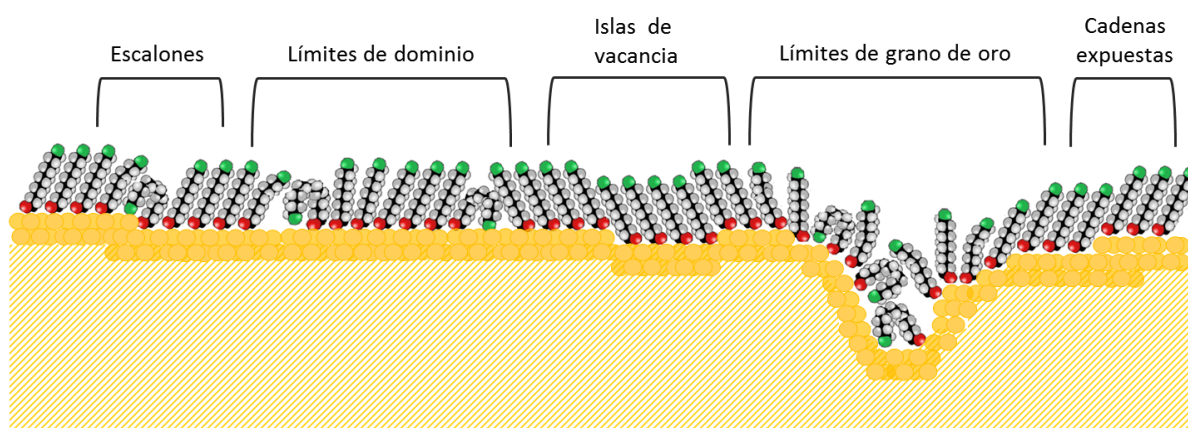
Es posible obtener cubrimientos densos rápidamente (milisegundos a segundos) a partir de soluciones de concentración milimolar. Sin embargo, la maximización de la densidad de moléculas y la disminución en el número de defectos son procesos que involucran una lenta reorganización y requieren horas.<sup>[10, 11]</sup> El uso de soluciones diluidas puede favorecer la calidad final de las SAMs ya que la organización estaría acompañada por la quimisorción. No obstante se debe tener en cuenta que para soluciones muy diluidas ( $< 1 \mu\text{M}$ ), pueden existir impurezas que compitan con los alcanotioles.<sup>[5]</sup> De este modo, el proceso de autoensamblado se complicaría debido a que la velocidad de desorción de los contaminantes afecta a la cinética de formación de las SAMs.



**Figura 3.3.** Esquema de las distintas etapas durante la autoorganización de un alcanotiol sobre Au(111): (i) fisisorción, (ii) quimisorción y formación de dominios de fase paralela, (iii) nucleación de la fase vertical, (iv) crecimiento de la fase vertical y reparación de defectos y vacancias.

El largo de cadena del alcanotiol y su grupo terminal también influyen en la formación y la calidad final de la SAM. Cada metileno adicional del esqueleto aumenta el número de fuerzas intermoleculares, lo cual favorece el empaquetamiento compacto. Respecto del grupo terminal, el grado de orden dependerá adicionalmente de si ocurre o no una estabilización inherente a la funcionalidad química (repulsiones electrostáticas y puentes de hidrógeno) o bien algún impedimento estérico debido a su tamaño.<sup>[12-14]</sup>

La elección del solvente no es trivial y juega un papel importante aunque los mecanismos que operan no son del todo comprendidos. La velocidad de liberación del solvente tras la adsorción de los tioles puede afectar la cinética de formación y condicionar las propiedades de barrera de la SAM. El etanol absoluto es uno de los solventes más empleados seguido de *n*-hexano y cloroformo, por medio de los cuales se obtienen SAMs de buena calidad.<sup>[5, 6]</sup> La presencia de oxígeno disuelto también tiene consecuencias desfavorables promoviendo la degradación de la SAM por formación de sulfonatos y otras especies oxigenadas en presencia de luz. En algunos casos es imprescindible desgasar el solvente con un gas inerte como Ar o N<sub>2</sub> antes de preparar la solución de tior y mantener la atmósfera inerte y los recipientes cubiertos durante la inmersión a fines de obtener monocapas reproducibles.



**Figura 3.4.** Esquema de los posibles defectos encontrados en las SAMs.

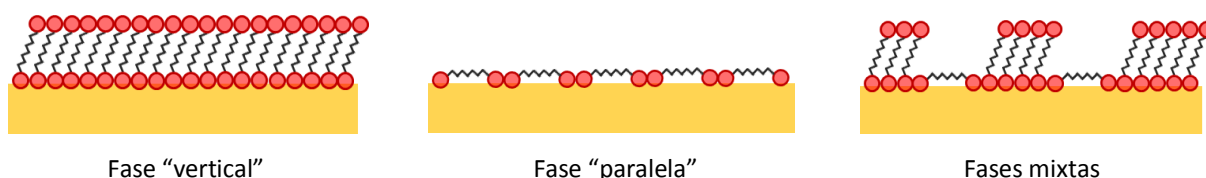
Por último debemos considerar que las SAMs son sistemas dinámicos y que si bien son estructuras muy ordenadas no están libres de defectos, algunos propios de las monocapas y otros inherentes al sustrato (**Figura 3.4**). El crecimiento de distintos dominios de moléculas en configuración vertical resulta en la formación de “límites” de dominios en



los cuales existe un alto grado de desorden. Estos defectos pueden corregirse parcialmente por el calentamiento de las muestras por debajo de su temperatura de desorción ( $T < 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Por otro lado, aun empleando sustratos orientados existen otras zonas además de las terrazas planas. Los escalones, islas de vacancias y límites de grano acomodan las moléculas con distintas orientaciones exhibiendo además distintas energías de unión. Ya que pueden representar un porcentaje importante de la superficie, estas posibilidades deben ser tenidas en cuenta para la correcta interpretación de resultados.

### 3.1.2 Alcanoditioles

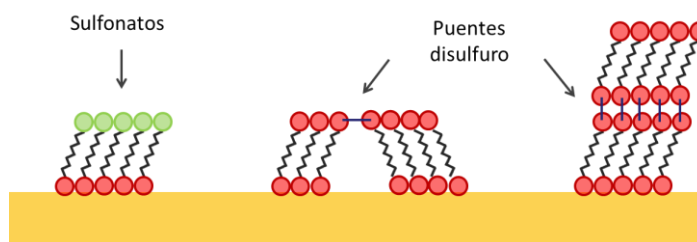
Las monocapas autoensambladas de  $\alpha,\omega$ -alcanoditioles han recibido una gran atención debido a la posibilidad de emplearlas como conectores entre dos entidades metálicas y/o semiconductoras ya sean sustratos planos, nanopartículas o películas delgadas depositadas.<sup>[15-20]</sup> Esto es posible debido a que estas moléculas disponen de dos grupos  $-\text{SH}$  funcionales separados por el esqueleto hidrocarbonado. A pesar de la extensa cantidad de publicaciones disponibles en literatura sobre la preparación y la aplicación de las SAMs de  $\alpha,\omega$ -alcanoditioles, la formación de las mismas en condiciones tales que se garantice su reproducibilidad es objeto de debate.<sup>[21-27]</sup> Uno de los principales problemas es la falta de control en la formación de las fases “paralelas” (**Figura 3.5**) en la cual las moléculas se unen a la superficie mediante ambos grupos  $-\text{SH}$ , por lo tanto, en lugar de una SAM de moléculas de  $\alpha,\omega$ -alcanoditioles unidas por sólo un grupo  $-\text{SH}$  (fase “vertical”) se obtienen fases mixtas.<sup>[28, 29]</sup> Para  $\alpha,\omega$ -alcanoditioles de cadena hidrocarbonada larga ( $n > 10$ ) existe la posibilidad de formar “bucles” además de fases paralelas extendidas.<sup>[30]</sup>



**Figura 3.5.** Esquema de las distintas fases que pueden formar las SAMs de alcanoditioles.

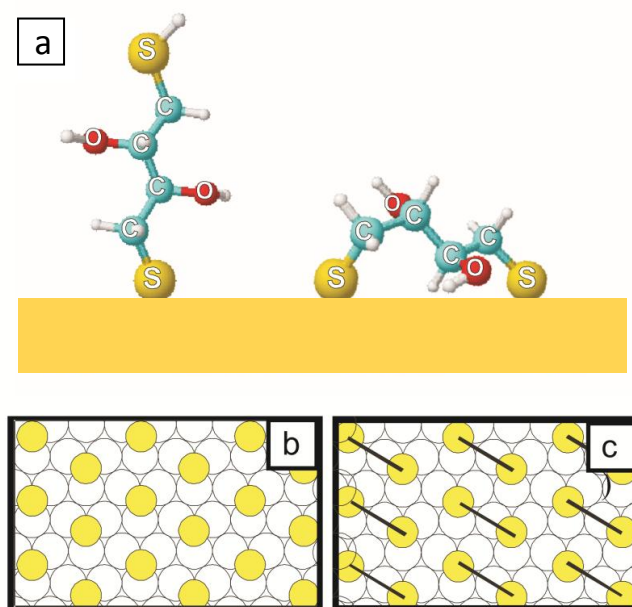


Debido a la reactividad del grupo -SH, otro inconveniente está relacionado con la posibilidad de degradación de estas SAMs por formación de sulfonatos<sup>[31]</sup> o puentes disulfuro entre moléculas vecinas o con moléculas extra para formar multicapas,<sup>[32-37]</sup> dependiendo del tipo de solvente utilizado y el procedimiento de preparación (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6.** Esquema de los productos de degradación de las SAMs de alcanoditioles.

A su vez, puede ser necesaria la optimización de una fase puramente “paralela”. El ditioneitol (DTT), un  $\alpha,\omega$ -butanoditiol con dos grupos -OH (**Figura 3.7a**) puede proveer una superficie completamente hidroxilada si logra unirse por ambos grupos -SH. Debido al largo de cadena, los S ocupan la misma posición tanto para la fase “vertical” (**Fig. 3.7b**) como para la fase “paralela” (**Fig. 3.7c**).<sup>[38]</sup>



**Figura 3.7.** a) Representación de la molécula de DTT en sus configuraciones “vertical” (izq.) y “paralela” (der.) de acuerdo a cálculos mediante un método semiempírico PM3. b) Red  $\sqrt{3} \times \sqrt{3} R30^\circ$  para las cabezas de S (amarillas) sobre un sustrato de Au(111) (blanco) para la fase “vertical”. c) Fase “paralela” de las moléculas bidentadas con las cabezas de S en la red  $\sqrt{3} \times \sqrt{3} R30^\circ$ .

Si los grupos  $\text{-OH}$  se encuentran disponibles, es posible coordinar cationes divalentes<sup>[39]</sup> e incluso son capaces de reaccionar con alcóxidos de  $\text{Ti(IV)}$  en síntesis sol-gel.<sup>[40]</sup> Además, en estas condiciones, la superficie cambia su ángulo de contacto de  $50^\circ$  a  $38^\circ$  respecto del oro limpio,<sup>[38]</sup> brindando un sustrato de carácter hidrofílico.

### **3.1.3 Objetivos del presente capítulo**

El fin esencial de este capítulo es mostrar el estudio sistemático de SAMs de distintos alcanotioles sobre sustratos de oro mediante técnicas electroquímicas, STM y XPS. Debido a que estas SAMs servirán como plataformas para los sistemas que se discutirán en los siguientes capítulos, es de suma importancia un meticuloso conocimiento previo de las características de ensamblado. La disposición de las cadenas hidrocarbonadas y de los grupos funcionales así como la presencia de defectos pueden ejercer una gran influencia sobre las modificaciones posteriores. En el caso de los alcanoditioles, también se pretende hallar las condiciones en las cuales se puede favorecer la formación de una fase en particular (“paralela” o “vertical”).

## **3.2 Experimental**

### **3.2.1 Sustratos de oro**

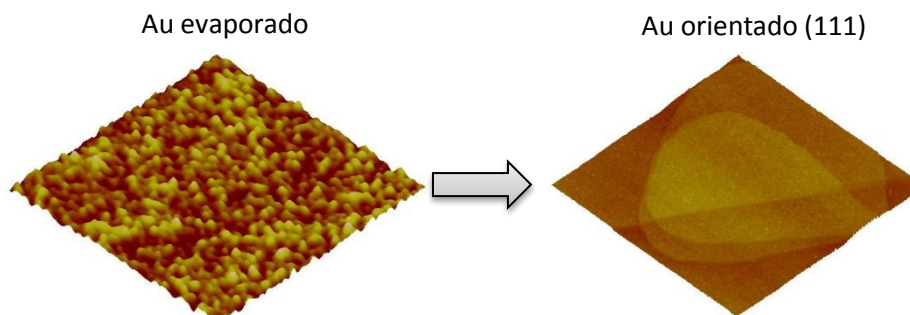
Se utilizaron películas delgadas de Au cuya superficie tiene orientación preferencial como sustratos para crecer las SAMs. Los sustratos de  $\text{Au(111)}$  se obtuvieron a partir de placas de Au evaporado sobre vidrio borosilicato “Robax” provistas por la firma Arrandee® de Werther, Alemania. Puesto que la adherencia del oro al vidrio no es buena, el fabricante deposita una capa intermedia de Cr de 1 a 4 nm de espesor para lograr una mejor adhesión del Au al soporte de vidrio. Las placas son de 11 mm x 11mm y el espesor de la película de oro informado es de  $250 \pm 50$  nm.

Las placas se lavaron inicialmente por inmersión durante 5 min en solución “piraña” que es frecuentemente utilizada para remover residuos orgánicos de los sustratos. Esta solución tiene una relación 3:1 entre volúmenes de ácido sulfúrico concentrado (98 % p/p) y solución de peróxido de hidrógeno concentrada (reactivo analítico 100 vol); y se prepara añadiendo muy lentamente el  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el ácido. Como es extremadamente corrosiva y

reacciona violentamente con la materia orgánica debe utilizarse con extrema precaución. Luego del lavado, las películas se enjuagaron con agua de alta pureza (MilliQ®) y se secaron en estufa a 160 °C o bien en una corriente de gas N<sub>2</sub>.

Las placas de Au evaporado son policristalinas, entonces, para obtener la orientación preferencial (111) y terrazas de tamaño adecuado se las debe someter a un tratamiento térmico conocido comúnmente como recocido. Las placas de Au limpias se expusieron a la llama de un mechero de butano y se calentaron hasta alcanzar un color rojo sombra, que corresponde a aproximadamente 650 °C. En ocasiones, los recocidos se realizaron con llama de gas hidrógeno, en especial cuando los sustratos debían ser caracterizados por STM o XPS.

Si se emplea la técnica de recocido, la textura dominante resulta (111) (para metales con empaquetamiento cúbico centrado en las caras como el Au, un arreglo hexagonal de átomos en la superficie) y el tamaño y forma de los granos cambia considerablemente; de una capa continua de granos pequeños (de ~ 10 a 50 nm), hacia un conjunto de granos de 2 a 3 µm que presentan terrazas planas con orientación preferencial (111) separadas por escalones monoatómicos (**Figura 3.8**).



**Figura 3.8.** Imágenes de STM de 1 µm x 1 µm del sustrato de oro empleado antes y después del recocido térmico, exhibiendo primero granos pequeños y luego terrazas planas separadas por escalones.

### 3.2.2 Reactivos

Los alcanotioles 1-propanotiol (PT) 99%, 1-butanotiol (BT) 99%, 1-hexanotiol (HT) 95%, 1-nonanotiol (NT) 95%, 1-decanotiol (DT) 96%, 1-dodecanotiol (DDT) 98%, 1-hexadecanotiol (HDT) 99% y 1-octadecanotiol (ODT) 98% utilizados fueron de la marca Sigma y Fluka. Los alcanoditioles 1,4-Butanoditiole (BdT) 97%, 1,6-hexanoditiole (HdT) 97% y 1,9-nonanoditiole (NdT) 97% fueron adquiridos marca Alfa Aesar y Sigma. El DL-ditiotreitol (DTT) 99% se compró marca Sigma. Todos estos reactivos se emplearon sin purificación

adicional. El resto de los reactivos y solventes empleados en este trabajo de Tesis fueron de grado analítico. Para las soluciones acuosas se empleó siempre agua MilliQ (18,2 M $\Omega$ ).

### **3.2.3 Preparación de SAMs**

Las SAMs se prepararon desde soluciones diluidas de cada tiol como se detalla a continuación.

#### *3.2.3.1 Alcanotioles*

Las soluciones de alcanotioles se prepararon pesando la cantidad necesaria del alcanotiol puro para obtener 100 mL de solución 5 mM en etanol absoluto. De esta solución madre se hicieron las diluciones requeridas para los experimentos.

Las SAMs de alcanotioles se formaron por inmersión de las placas de Au(111) en soluciones 50  $\mu$ M durante 24 hs en ausencia de luz a temperatura ambiente. Después de este periodo, se las enjuagó con abundante etanol absoluto. Los restos de solvente se removieron por secado en un flujo de N<sub>2</sub>.

#### *3.2.3.2 Alcanoditioles*

En este caso se emplearon dos protocolos de preparación distintos. El primero (procedimiento I) respetó el método utilizado para las SAMs de alcanotioles. Para el segundo (procedimiento II) se emplearon soluciones 1 mM en *n*-hexano. Previamente a la inmersión de las placas de Au(111), las soluciones se desoxigenaron con una corriente de N<sub>2</sub>. También durante la inmersión se conservó la desoxigenación y se empleó un sistema de reflujo para evitar la formación de vapores de *n*-hexano (poseen efectos tóxicos sin son inhalados) y además el cambio de concentración de las soluciones. Los tiempos típicos de inmersión ( $t_i$ ) fueron de 1 h y se tuvo la precaución de evitar el contacto con la luz cubriendo todos los recipientes con papel de aluminio.

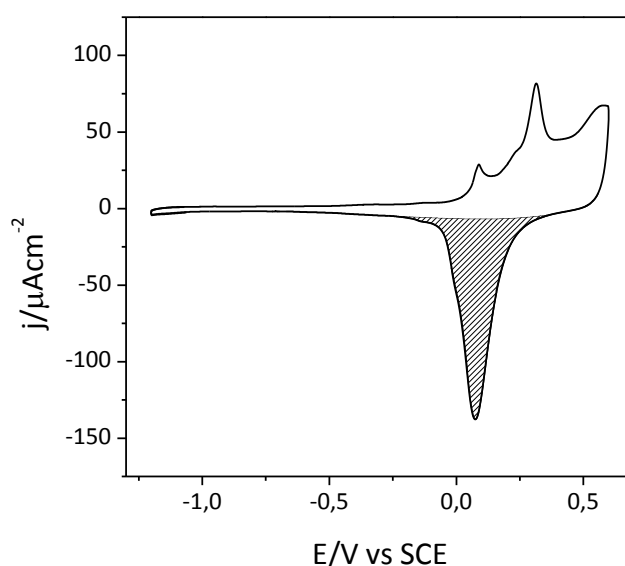
#### *3.2.2.3 Ditiotreitól*

Las soluciones de ditiotreitól (DTT) se prepararon en etanol absoluto. Se emplearon concentraciones de 50  $\mu$ M y 5 mM, tiempos variables de inmersión y dos temperaturas (ambiente y 60 °C) para la formación de SAMs.

### 3.2.4 Medidas electroquímicas

Las medidas de voltamperometría cíclica se realizaron con un potenciostato con capacidad de adquisición digital de datos. Se empleó una celda electroquímica de vidrio de tres electrodos. Como electrodos de referencia se utilizaron electrodos de calomel saturado (SCE) preparados en el laboratorio, cuyos potenciales se revisaron después de cada medida contra un electrodo de calomel saturado comercial (Methrom). El contraelectrodo fue una lámina de Pt de gran área y los electrodos de trabajo, las placas de Au modificadas con SAMs de tioles. La solución electrolítica fue solución acuosa de NaOH 0,1 M, preparada a partir de NaOH sólido (de Baker grado analítico) y agua MilliQ. Previamente a las medidas, la solución fue desoxigenada en la celda electroquímica mediante burbujeo de N<sub>2</sub>.

Las medidas de electrodesorción reductiva de las SAMs de tioles se realizaron a una velocidad de barrido  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$  a temperatura ambiente. Después de cada medida se removió todo el material de la superficial por ciclado sucesivo hasta obtener un voltamperograma de oro limpio.<sup>[41]</sup> Los datos de densidad de corriente ( $j$ ) están expresados con respecto al área del electrodo de Au, calculada a partir de la integración del pico de reducción de óxido de oro (**Figura 3.9**), siguiendo el procedimiento descrito en literatura.<sup>[42]</sup>



**Figura 3.9.** Voltamperograma cíclico de un electrodo de Au(111) después de haber removido una SAM de DDT.

Los voltamperogramas cíclicos mostrados para cada tiol son representativos del comportamiento observado mientras que los datos de densidad de carga son resultado del promedio de al menos 10 medidas independientes.

### 3.2.5 Medidas de STM

Las imágenes de STM *ex situ* se adquirieron mediante un microscopio modelo Nanoscope IIIa, de la marca Digital Instruments, Inc. (Santa Barbara, CA, EEUU). Las medidas se realizaron en general con los *scanners* que permiten barrer un campo máximo de unos 10  $\mu\text{m}$ . También se realizaron algunas medidas con *scanners* adecuados para obtener resolución atómica, que permiten barridos en campos máximos de 929 nm. Se emplearon puntas comerciales de Platino-Iridio (Nanoprobe<sup>TM</sup> STM tips) de 8 mm de largo y 0,25 mm de diámetro que fueron limpiadas con corriente de nitrógeno antes de su uso. En cuanto al modo de operación del STM, todas las imágenes que se muestran en este trabajo han sido tomadas en el modo de corriente constante. En general se usaron voltajes túnel  $V_T$  positivos entre 0,01 y 1,5 V y las corrientes habituales fueron 0,15 - 2 nA. El programa de análisis de las imágenes es el que provee la empresa fabricante del microscopio (versión 4.22).

### 3.2.6 Medidas de XPS

Para caracterizar las muestras por XPS se utilizó una fuente de Mg K $\alpha$  (XR50, Specs GmbH) y un analizador de energía de electrones hemiesférico (PHOIBOS 100, Specs GmbH). Previo a las medidas, se hizo una calibración de la escala de energía de dos puntos usando muestras de oro evaporado limpio (Au 4f<sub>7/2</sub>, energía de unión ( $E_B$ ) = 84,00 eV) y cobre (Cu 2p<sub>3/2</sub>,  $E_B$  = 933,67 eV).

Para la deconvolución de los espectros en la región de S 2p, se sustrajo un fondo del tipo Shirley y se usó una combinación de funciones Lorenziana y Guassiana (Voigt). El ancho completo a mitad del máximo (fwhm) se fijó en 1,1 eV y la separación del doblete spin-órbita de la señal S 2p se estableció en 1,2 eV. Las energías de unión y las áreas de pico fueron optimizadas para obtener el mejor ajuste.

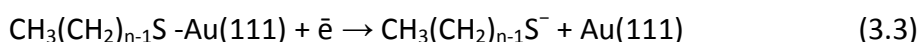
El recubrimiento de S fue estimado a través de la medida de las áreas de las señales de Au 4f y S 2p corregidas por el factor de sensibilidad relativa (RSF) de cada elemento. La

señal de Au 4f fue corregida por la distancia de atenuación de los electrones en el Au considerando solamente la señal de la monocapa atómica del Au superior. Por lo tanto, el recubrimiento de S es el cociente de átomos de azufre respecto a los átomos de oro de la superficie, teniendo en cuenta cada estado químico del azufre.

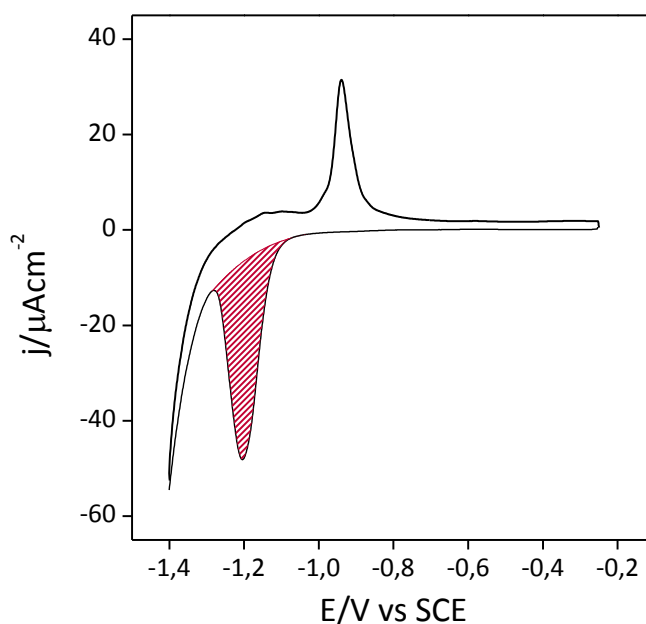
### 3.3 Alcanotioles

Se formaron SAMs de alcanotioles  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{n-1}\text{SH}$  con  $n = 3 - 18$  sobre Au por inmersión de los sustratos en soluciones diluidas. Con el fin de caracterizar la calidad de las SAMs se emplearon distintas técnicas de superficie.

En primer lugar, se empleó voltamperometría cíclica para estudiar la electrodesorción reductiva de los tioles. Si a un electrodo de Au recubierto por una SAM se le aplica un potencial en dirección negativa se alcanza un valor de potencial al cual las moléculas de alcanotiol quimisorbidas son removidas de la superficie. Este proceso se puede representar con la siguiente ecuación:



La **Figura 3.10** muestra el voltamperograma cíclico de 1-dodecanotiol (DDT) en NaOH 0,1M a una velocidad de barrido  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$  desde -0,3 V hasta -1,4 V (primer ciclo). Precediendo la descarga de hidrógeno (HER), se puede observar a -1,20 V un pico de corriente. Este pico está asociado mayormente a la desorción de la monocapa del tiol quimisorbido en las terrazas (111) del sustrato de Au, pudiéndose describir en parte con la ecuación (3.3). La integración de dicho pico proporciona la densidad de carga  $q = 78 \pm 6 \mu\text{Ccm}^{-2}$ , que está de acuerdo al valor esperado para la red  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° de alcanotioles sobre terrazas (111) siendo de  $\approx 74 \mu\text{Ccm}^{-2}$ . La línea de base tenida en cuenta para los cálculos de carga fue generada a partir de un polinomio de interpolación cúbico conocido como *spline* y en todos los casos se trató de descontar las contribuciones de la doble capa. Sin embargo, el hecho de que sistemáticamente los valores de carga sean mayores al valor esperado puede denotar que el proceso no es tan simple como para ser descrito únicamente por la ecuación (3.3) como ya ha sido mencionado por algunos autores.<sup>[43]</sup>



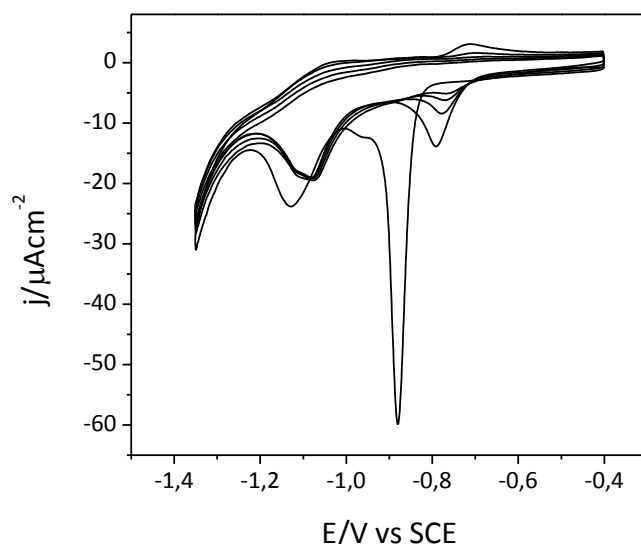
**Figura 3.10.** Voltamperograma cíclico de una SAM de DDT sobre Au(111) en solución de NaOH 0,1 M a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ .

Cuando se invierte el barrido de potencial hacia valores más positivos aparece un pico (-0,94 V) que corresponde a la readsorción oxidativa del tiol. Esta readsorción es mayor cuanto más rápido es el barrido y cuanto mayor es el largo de la cadena hidrocarbonada. Esto se debe a que los alcanotioles tienen baja solubilidad en soluciones acuosas como el NaOH 0,1M y una fracción importante de ellos permanece fisisorbida luego de la desorción.

Si se analizan alcanotioles de cadena hidrocarbonada con  $n < 9$ , además del pico asociado a la ecuación (3.3), se puede encontrar un segundo pico a potenciales más negativos (**Figura 3.11**). Este pico es ciertamente más indefinido y en alcanotioles de  $n > 9$  podría estar presente pero enmascarado por HER. La presencia de este pico es motivo de discusión y se han propuesto diferentes explicaciones acerca de su origen. Una de ellas atribuye este pico a la adsorción de tioles en bordes de escalón,<sup>[44]</sup> que son sitios donde existe mayor coordinación entre el S y el Au respecto a las terrazas (111). De este modo, se necesitaría un potencial más negativo para poder remover estos tioles de la superficie. Se puede observar en la **Fig. 3.11**, que en los sucesivos ciclos el pico principal disminuye su área y el potencial se corre a valores más positivos. Esto se debe a que luego de la readsorción del tiol, además de la pérdida de material por disolución en el electrolito, se forman dominios desordenados donde las interacciones de van der Waals no están maximizadas. Por el

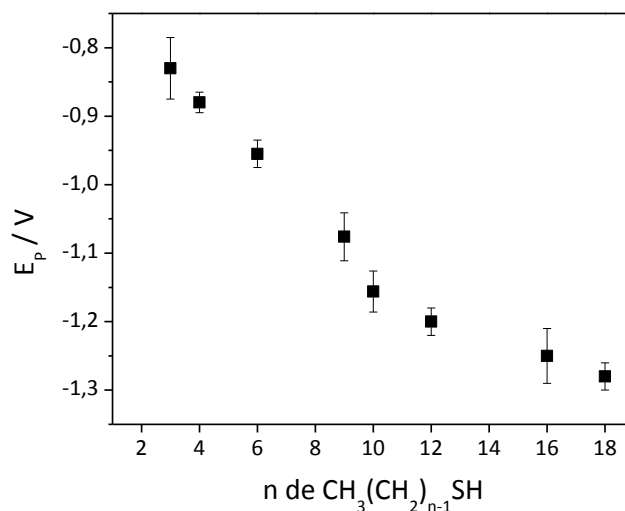


contrario, el pico que aparece a potenciales más negativos apenas se modifica bajo estas condiciones de barrido, denotando la mayor interacción entre el S y el Au en los defectos de sustrato.<sup>[45, 46]</sup>



**Figura 3.11.** Voltamperograma cíclico de una SAM de BT sobre Au(111) en solución de NaOH 0,1 M a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ .

Si se analiza el potencial al cual ocurre la desorción de los alcanotiolatos, se puede concluir que depende de muchos factores, incluyendo el largo de cadena, el grado de orden y número de interacciones intermoleculares y la calidad del sustrato. A medida que aumenta el largo de la cadena hidrocarbonada, son mayores las interacciones de van der Waals entre las cadenas. De este modo, aumenta la estabilidad de la SAM y, consecuentemente, se necesita un mayor potencial para efectuar la electrodesorción. A un mayor tiempo de inmersión para la formación de la SAM, las cadenas hidrocarbonadas se organizan en dominios cristalinos, optimizando las interacciones de van der Waals. Entonces empleando sustratos de similares características (rugosidad y tamaño de terrazas), podemos observar cómo el potencial del pico de desorción ( $E_p$ ) se desplaza linealmente en dirección más negativa a medida que aumenta el largo de la cadena, reflejando el incremento en las fuerzas intermoleculares y la mayor dificultad para la desorción (**Figura 3.12**). Se puede destacar que el potencial varía marcadamente para tioles con  $n \leq 10$ , mientras que la variación es mucho menor para tioles de cadena más larga.



**Figura 3.12.** Representación del potencial de pico  $E_p$  en función del largo de cadena hidrocarbonada  $n$  de alcanotiol.

Cuando se autoensambla un alcanotiol de cadena larga sobre el electrodo de oro, la capa de Helmholtz cambia de una mezcla de iones y solvente de alta constante dieléctrica a una capa de cadenas hidrocarbonadas libre de iones con una baja constante dieléctrica, reduciéndose la capacidad de la interfaz.<sup>[47]</sup> De este modo, disminuyen procesos tales como la oxidación del electrodo y el intercambio de electrones con cuplas redox presentes en la solución. Las medidas de la capacidad de la doble capa ( $C_{DC}$ ) son no destructivas para la SAM y permiten monitorear el proceso de autoorganización in situ o evaluar un empaquetamiento pobre, que llevaría a un aumento en la penetración del solvente y/o iones. Para la determinación de la  $C_{DC}$ , se barrió una zona de potencial (-0,3 V a -0,5 V) donde no ocurren procesos faradaicos ni pseudofaradaicos. La capacidad de la interfaz entre el electrodo de trabajo y la solución puede deducirse a partir de la medida de la diferencia entre las densidades de corriente correspondientes a los barridos en sentido positivo,  $j_{dc}^+$ , y negativo,  $j_{dc}^-$ , las que están dadas por:<sup>[47]</sup>

$$j_{DC}^+ = \nu C_{DC} \quad (3.4a)$$

$$j_{DC}^- = -\nu C_{DC} \quad (3.4b)$$

A partir de las ecuaciones (3.4a) y (3.4b), se deduce:

$$j_{DC}^+ - j_{DC}^- = 2\nu C_{DC} \quad (3.5)$$

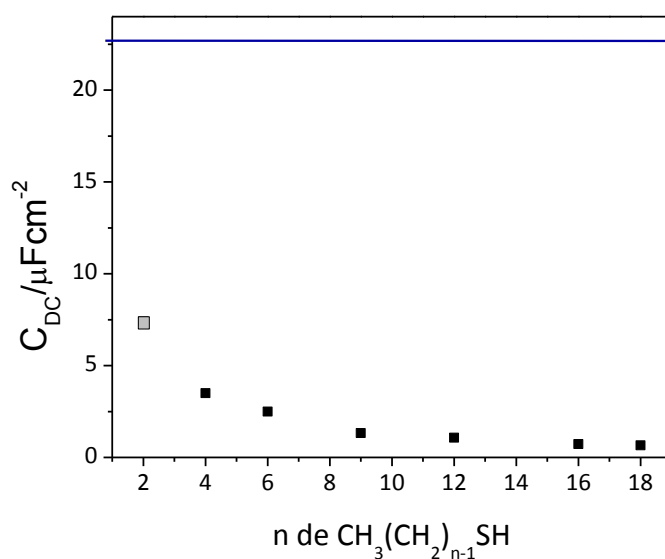
Entonces, la diferencia  $j_{DC}^+ - j_{DC}^-$ , también llamada “ancho de la doble capa” es una medida directa de la  $C_{DC}$ , ya que la velocidad de barrido es una constante. Cabe destacar que estas medidas son válidas siempre que el área del contraelectrodo sea mucho mayor que la del electrodo de trabajo. Entonces, si se considera un circuito de capacitores en serie:

$$\frac{1}{C_{celda}} = \frac{1}{C_{DC}} + \frac{1}{C_{DC}^{CE}} \quad (3.6)$$

$$C_{celda} = \frac{C_{DC} C_{DC}^{CE}}{C_{DC} + C_{DC}^{CE}} \quad (3.7)$$

Siendo  $C_{DC} \ll C_{DC}^{CE}$  puede aceptarse la aproximación  $C_{celda} \cong C_{DC}$ .

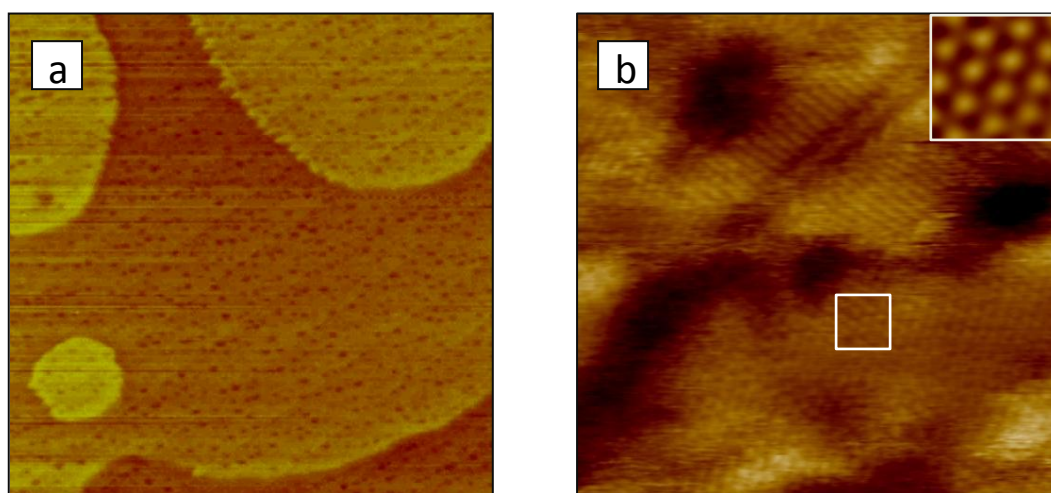
Las capacidades de las interfaces dependen de diversos factores, entre ellos, los recubrimientos y la naturaleza de las especies adsorbidas. Al adsorberse los alcanotioles se produce un descenso de la constante dieléctrica del medio, por lo tanto, se observará una disminución de la capacidad de la interfaz. Para un dado alcanotiol, la mínima  $C_{DC}$  se obtiene para el máximo recubrimiento de la superficie, es decir, para una monocapa completa formada a tiempos largos de inmersión. Todos los alcanotioles disminuyen significativamente la  $C_{DC}$  respecto del Au(111) sin modificar (**Figura 3.13**), aunque esta variación es más marcada entre los de cadena más corta.



**Figura 3.13.** Capacidad de la doble capa  $C_{DC}$  en función del largo de cadena hidrocarbonada  $n$  de alcanotiol medida en NaOH 0,1 M a  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$  en una ventana de potencial de  $-0,3 \text{ V}$  a  $-0,5 \text{ V}$ . La línea azul indica la capacidad del Au(111) medida en las mismas condiciones. En gris, dato extraído de Ref. [48].

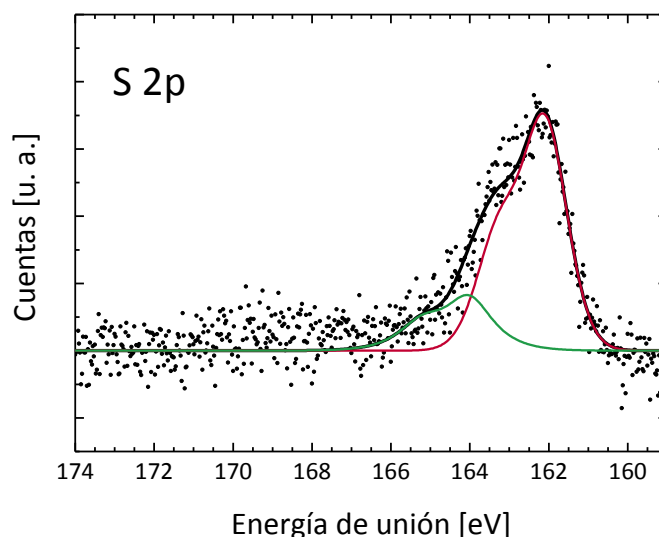
Otra caracterización no destructiva que nos brinda información sobre la calidad de las SAMs es la microscopía por efecto túnel (STM). Las muestras se preparan del mismo modo que para voltamperometría cíclica y en muchos casos se hizo esta caracterización previamente a la electrodesorción reductiva. La **Figura 3.14a** muestra una imagen ex situ de terrazas de Au(111) recubiertas de una SAM de DDT. En este campo se puede observar que toda la superficie se halla decorada por pequeñas zonas de menor altura llamadas “agujeros” o “*pits*”. Estas zonas también están cubiertas por moléculas de alcanotiol. Debido a que la profundidad de estos “agujeros” es de 0,25 nm, la altura que separa dos planos de Au(111), se trataría de islas bidimensionales de vacancias de átomos de Au.<sup>[7]</sup> Estas vacancias se deben a la reconstrucción de la estructura del oro por relajación promovida por la adsorción del alcanotiol.<sup>[7]</sup> A mayor resolución (**Fig. 3.14b**), se pudieron apreciar los dominios  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30°. Esta red y su superred  $c(4 \times 2)$  son las estructuras más estables en SAMs de alcanotioles. En ambos casos la distancia entre vecinos más próximos es de  $\sim 0,5$  nm con un cubrimiento de  $\theta = 0,33$ .

La obtención de las redes con resolución molecular fue posible para alcanotioles de largo de cadena entre  $4 < n < 12$ . Para cadenas hidrocarbonadas de mayor longitud se dificulta la obtención de imágenes por STM debido a que actúan como aislantes impidiendo la conducción de la corriente túnel.



**Figura 3.14.** a) Imagen de STM ex situ de 300 nm x 300 nm de una SAM de DDT sobre Au(111) mostrando los pits característicos. b) Ampliación de 15 nm x 15 nm donde se observan dominios  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30°. El recuadro de 1,5 nm x 1,5 nm muestra una imagen de mayor resolución de esta red.

Si bien ya se caracterizó la cantidad de moléculas quimisorbidas y su disposición, aún resta conocer el estado químico del S en la interfaz tiol/Au. Las medidas de XPS brindan una valiosa información a través del análisis del S 2p. En efecto, las SAMs de tioles sobre metales se caracterizan por la presencia de un doblete del S 2p una energía de unión ( $E_B$ ) de 162 eV, la cual es típica de una unión tiolato.<sup>[49]</sup> En muchos casos también es posible observar contribuciones a 161 eV que corresponden a sulfuro adsorbido y a 163,5 eV que puede ser asignado a tioles (SH) libres o bien enlaces disulfuro.<sup>[49]</sup> En este caso, se ajustó la señal a dos dobletes centrados en 162,0 eV y 163,5 eV (**Figura 3.15**). La cantidad de tiolatos calculada a partir de la señal a 162,0 eV coincide con la esperada para una monocapa formando una red  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° ( $\theta = 0,33$ ).<sup>[8]</sup> El componente a 163,5 eV corresponde a moléculas fisisorbidas que pueden ser eliminadas mediante un cuidadoso enjuague con el solvente de preparación antes de introducirlas a la cámara de UHV. En algunos casos se pueden observar componentes a mayores energías de unión (167-168 eV) propias de especies oxidadas de S tales como sulfonatos producidas como consecuencia de la exposición de las muestras al aire y a la luz durante períodos prolongados de tiempo.<sup>[50]</sup>



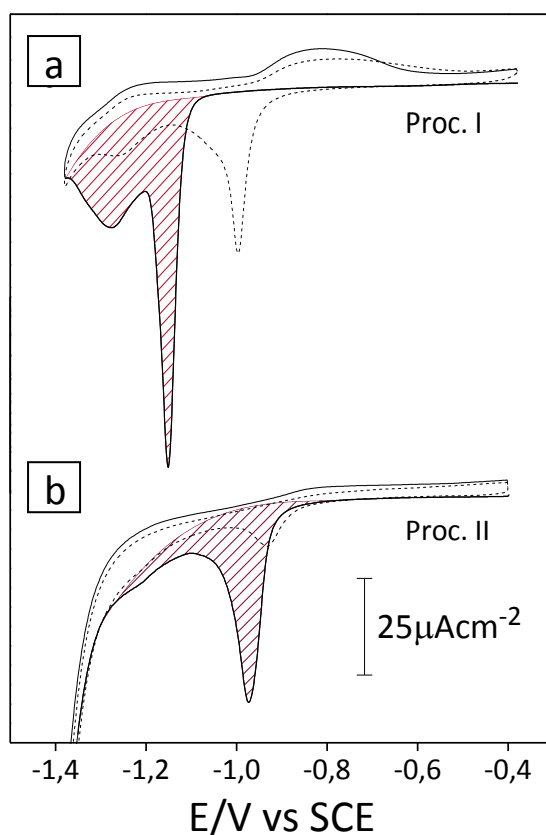
**Figura 3.15.** Espectro de XPS correspondiente a S 2p de una SAM de BT sobre Au(111).

### 3.4 Alcanoditioles

Los  $\alpha,\omega$ -alcanoditioles pueden unirse a la superficie de Au por uno o dos grupos tiol por molécula. La conformación de las monocapas (fases paralelas o verticales) está directamente relacionada con los enlaces formados. A continuación veremos cómo el largo de cadena hidrocarbonada y el tipo de preparación de la SAM influyen en la conformación adoptada.

#### 3.4.1 Hexanoditiol

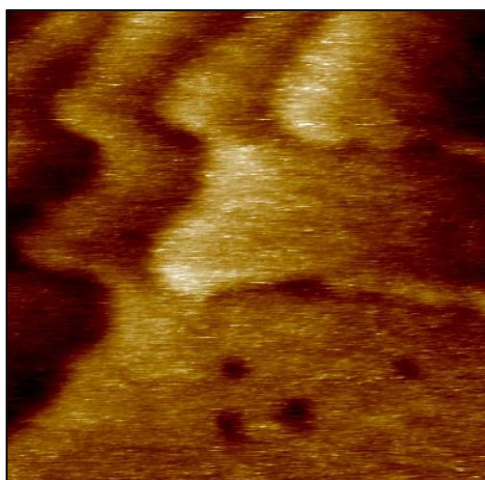
Si se prepara una SAM de 1,6-hexanoditiol (HdTT) por el método empleado para alcanotioles (en adelante, Proc. I), se obtiene un pico principal de electrodesorción reductiva (**Figura 3.16a**) a un potencial más negativo (-1,14 V) con respecto al 1-hexanotiol (-0,955 V). Además, se puede observar un segundo pico menos definido a  $\approx -1,28$  V precediendo a la HER.



**Figura 16.** Voltamperogramas cíclicos de SAMs de HdT sobre Au(111) en solución de NaOH 0,1 M a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$  formadas por a) Proc. I:  $t_i = 24\text{hs}$  en solución HdT  $50 \mu\text{M}$  en etanol absoluto y b) Proc. II:  $t_i = 1\text{h}$  en solución HdT  $1 \text{ mM}$  en *n*-hexano desoxigenado. Se muestran el primer (—) y segundo (---) ciclo en cada caso.

Otra característica remarcable es el aumento en la cantidad de material readsorbido, también respecto del HT. Este comportamiento ya había sido observado por Esplandiu *et al.*,<sup>[48]</sup> quienes trataron de explicar la discrepancia debido a la formación de enlaces disulfuro entre los grupos terminales de moléculas vecinas. Descartaron la formación de multicapas, que explicaría el corrimiento del potencial a valores más negativos, ya que las medidas de capacidad de doble capa eran similares para HdT y HT, como también se observó en nuestras experiencias. También desecharon la formación de fases paralelas ya que en este caso se formaría una red en la cual cada molécula ocupa más espacio por unidad de área respecto de la fase vertical,<sup>[51]</sup> que brindaría consecuentemente una densidad de carga mucho menor ( $q \approx 56 \mu\text{Ccm}^{-2}$ ).

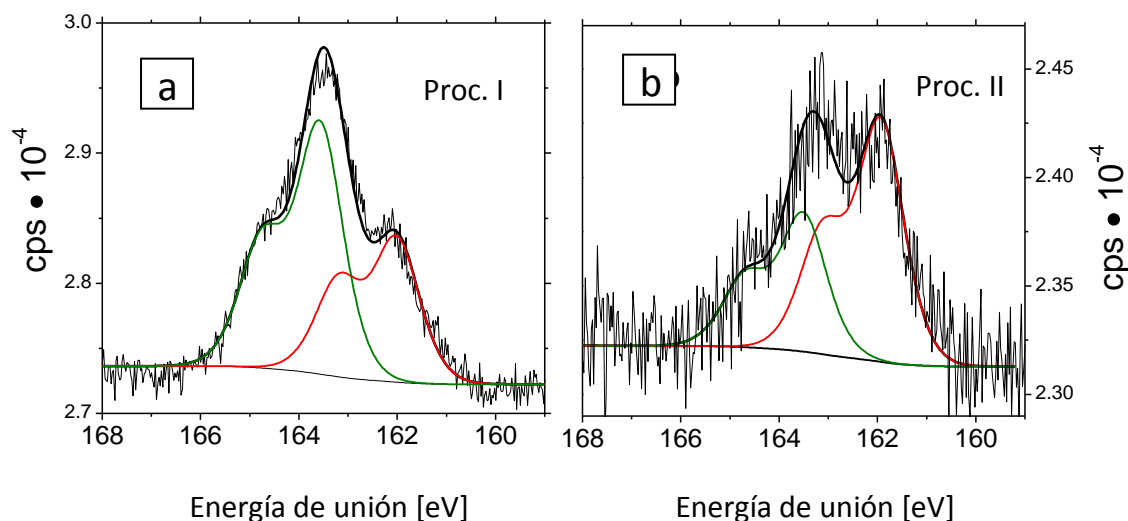
Las imágenes de STM tampoco proporcionan información esclarecedora acerca de la naturaleza de esta SAM (**Figura 3.17**). En campos como los que se muestran, es posible observar los pits característicos pero no se llega a obtener resolución molecular de una red ordenada del tipo  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30°, resultado también compartido por otros autores.<sup>[48, 51, 52]</sup>



**Figura 3.17.** Imagen de STM ex situ de 50 nm x 50 nm de una SAM de HdT sobre Au(111) preparada por Proc. I.

Las medidas de XPS constituyen una buena opción para entender la naturaleza del sistema. En la **Figura 3.18a** se puede observar el espectro de la SAM de HdT sobre Au(111) preparada por el Proc. I. La señal de S 2p se puede ajustar con dos dobletes tal como se hizo para los alcanotioles. A primera vista, se puede apreciar que la componente a 163,5 eV es

considerablemente mayor respecto a la componente a 162,0 eV. Si se tuviera una monocapa de moléculas de HdT en configuración vertical, la cantidad de tiolato (162,0 eV) debería ser igual a la encontrada en una SAM de alcanotiol. En efecto, para HdT esta componente corresponde a  $\theta = 0,33$ .



**Figura 3.18.** Espectros de XPS correspondiente a S 2p de SAMs de HdT sobre Au(111) preparadas por a) Proc. I y b) Proc. II.

La componente a 163,5 eV, correspondiente a grupos tiol (SH) sin unir debería arrojar el mismo valor que la componente a 162,0V, sin embargo el valor de cubrimiento calculado a partir de la relación entre las señales de S/Au es de  $\theta = 0,41 \pm 0,03$ , un 27% mayor a lo esperado. Enjuagues repetitivos descartan la posibilidad de moléculas fisisorbidas, por lo tanto, este exceso en la componente a 163,5 eV puede ser asociado no sólo a grupos tiol libres sino a enlaces disulfuro que unen una segunda capa parcial de moléculas. Cabe destacar que en ninguno de los experimentos se detectaron especies oxidadas de S (cuyas señales se encuentran en 167-168 eV).

Mediante medidas de RAIRS, SFG y elipsometría, Hamoudi *et al.*<sup>[53]</sup> llegaron a la conclusión de que el empleo de etanol absoluto como solvente y el uso de soluciones sin desoxigenación conducían a una pobre organización de las SAMs de NdT (1,9-nonanoditiol). En colaboración con este grupo, se decidió emplear el procedimiento de preparación alternativo que propusieron para formar las SAMs de HdT. Este procedimiento utiliza soluciones más concentradas (1 mM), *n*-hexano como solvente y desoxigenación previa de la solución (Proc. II). La **Fig. 3.16b** muestra un voltamperograma cíclico de una SAM de



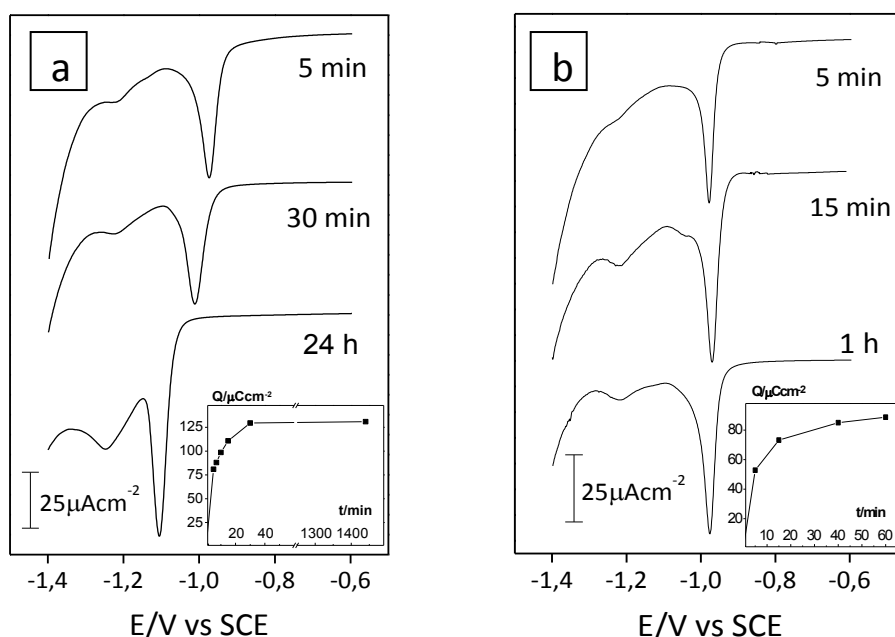
HdT obtenida mediante el Proc. II. El potencial del pico principal de electrodesorción reductiva es de  $-0,97$  V ( $E_p$  (HT) =  $-0,955$  V). Se puede observar un pequeño hombro precediendo la HER y una readsorción moderada, tal como se observa para HT. La densidad de carga,  $q = 81 \pm 4 \mu\text{C cm}^{-2}$ , es consistente con la presencia de la red  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30°, que como hemos descrito para alcanotioles corresponde a una fase de moléculas de HdT en configuración vertical.

Las imágenes de STM de baja resolución (campos grandes) volvieron a mostrar los pits característicos producidos en la adsorción de los tioles. Sin embargo a mayor resolución tampoco se pudo obtener información a nivel molecular de la red que forman las moléculas en la superficie del Au. Esta dificultad fue observada por otros autores y adjudicada a la interacción de los grupos tiol con la punta de Pt/Ir del STM.<sup>[48, 51]</sup>

La **Figura 3.18b** muestra los resultados de XPS para SAMs de HdT según el Proc. II. Ajustando la señal a dos dobletes, se puede observar que la componente a  $162,0$  eV excede a la de  $163,5$  eV. Además, la relación S/Au estima un cubrimiento de  $\theta = 0,23 \pm 0,03$ , un valor menor al esperado para una fase vertical completa ( $\theta = 0,33$ ). Por lo tanto, podemos interpretar estos resultados considerando una monocapa mixta con dominios de moléculas en fase vertical y dominios de moléculas en fase paralela. La contribución de cada una estas dos fases a la monocapa puede obtenerse de la relación  $162 \text{ eV}/163,5 \text{ eV}$  que en este caso nos lleva a un 65% de moléculas en fase vertical y un 35% en fase paralela.

Para comprender la autoorganización de las SAMs de HdT según ambos procedimientos se hicieron medidas de cinética de formación calculando la carga a partir de las curvas de electrodesorción en función del tiempo de inmersión,  $t_i$  (**Figura 3.19**). Siguiendo el Proc. I (**Fig. 3.19a**), el aumento en  $t_i$  produce un corrimiento en  $E_p$  desde  $-0,97$  V hasta  $-1,14$  V mientras que  $q$  aumenta de  $55 \mu\text{C cm}^{-2}$  a  $130 \mu\text{C cm}^{-2}$ . Los valores de  $q$  a  $t_i < 10$  min son significativamente más altos comparados con los hallados en alcanotioles utilizando el mismo procedimiento,<sup>[9]</sup> lo que indicaría que la saturación de la superficie se alcanza más rápidamente. Por otro lado, a través del Proc. II (**Fig. 3.19b**) no se observa desplazamiento en  $E_p$  mientras que el aumento en  $q$  es de  $53 \mu\text{C cm}^{-2}$  a  $81 \mu\text{C cm}^{-2}$ . En este caso, teniendo en cuenta que se trata de una concentración milimolar, la saturación de la superficie ocurre más lentamente. En ambos casos, los valores de  $q$  a  $t_i < 10$  min podrían estar asociados al predominio de la fase paralela. Luego, para  $t_i > 10$  min comienza el crecimiento de dominios

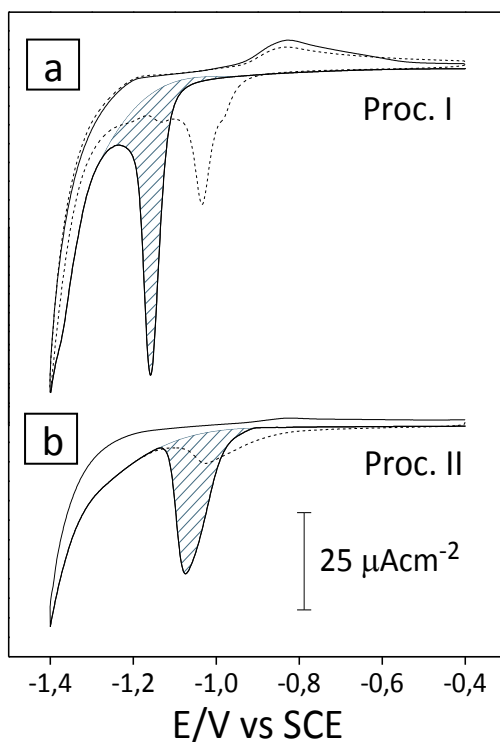
de fase vertical que aumentan la densidad de moléculas en la superficie, por lo tanto, incrementan los valores de  $q$ . En el caso del Proc. I, según los experimentos de XPS a tiempos más largos se produciría la formación de una segunda capa parcial unida por puentes disulfuro que sería responsable del gran corrimiento en  $E_p$  y aumento en  $q$ .



**Figura 3.19.** Voltamperogramas cíclicos de SAMs de HdT sobre Au(111) en solución de NaOH 0,1 M a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$  formadas con distintos tiempos de inmersión por a) Proc. I y b) Proc. II. Los recuadros al pie muestran la variación de la carga en función del tiempo de inmersión para cada caso.

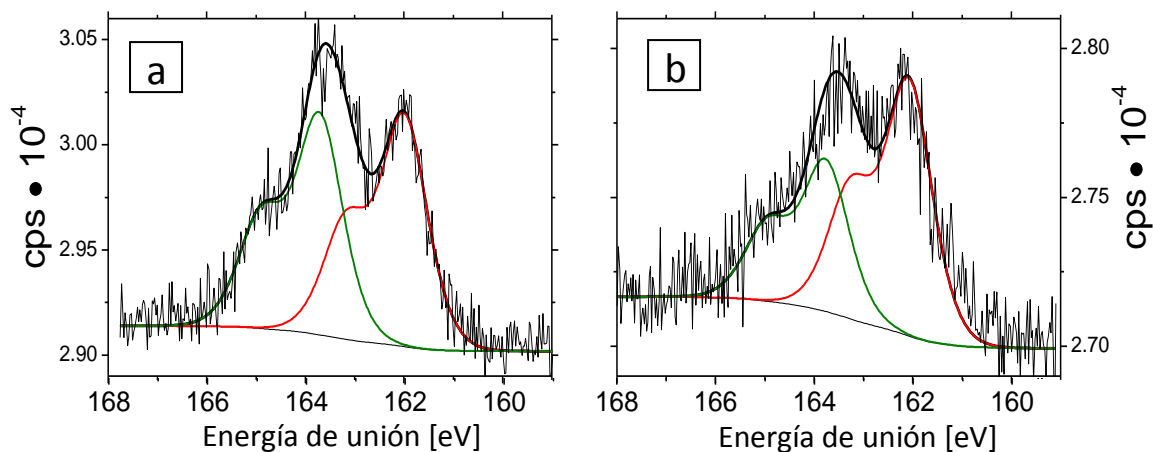
### 3.4.2 Nonanoditiol

En vista de los resultados de HdT, se comparó el empleo de ambos procedimientos en la formación de SAMs de 1,9-nonanoditiol (NdT). La **Figura 3.20** muestra los voltamperogramas cíclicos de electrodesorción reductiva para SAMs formadas a partir del Proc. I (**Fig. 3.20a**) y Proc. II (**Fig. 3.20b**). En el primer caso se puede observar un pico principal con  $E_p = -1,15 \text{ V}$  con una  $q$  asociada de  $81 \pm 6 \mu C cm^{-2}$ , sin picos previos a HER como se observa para alcanotioles con  $n > 8$ . La carga es la esperada para una SAM en fase vertical mientras que  $E_p$  tiene un valor más próximo al encontrado para 1-decanotiol (DT,  $-1,16 \text{ V}$ ) que para 1-nonanotiol (NT,  $-1,08 \text{ V}$ ). Respecto del Proc. II, el  $E_p$  se encuentra en  $-1,09 \text{ V}$ , también en este caso no hay pico precediendo a HER, y  $q$  es de tan solo  $60 \pm 5 \mu C cm^{-2}$  con muy poca readsorción en el ciclo inverso.



**Figura 3.20.** Voltamperogramas cíclicos de SAMs de NdT sobre Au(111) en solución de NaOH 0,1 M a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$  formadas mediante: a) Proc. I:  $t_i = 24 \text{ hs}$  en solución NdT  $50 \mu\text{M}$  en etanol absoluto y b) Proc. II:  $t_i = 1 \text{ h}$  en solución NdT  $1 \text{ mM}$  en *n*-hexano desoxigenado. Se muestran el primer (—) y segundo (---) ciclo en cada caso.

Recurrimos entonces a las medidas de XPS para dilucidar la relación de fases (vertical/paralela) en las SAMs de NdT según cada procedimiento (**Figura 3.21**). En ambos casos, el cubrimiento  $\theta$  es ligeramente menor al esperado ( $\theta = 0,33$ ) para una fase vertical completa, descartando a su vez la formación de multicapas.

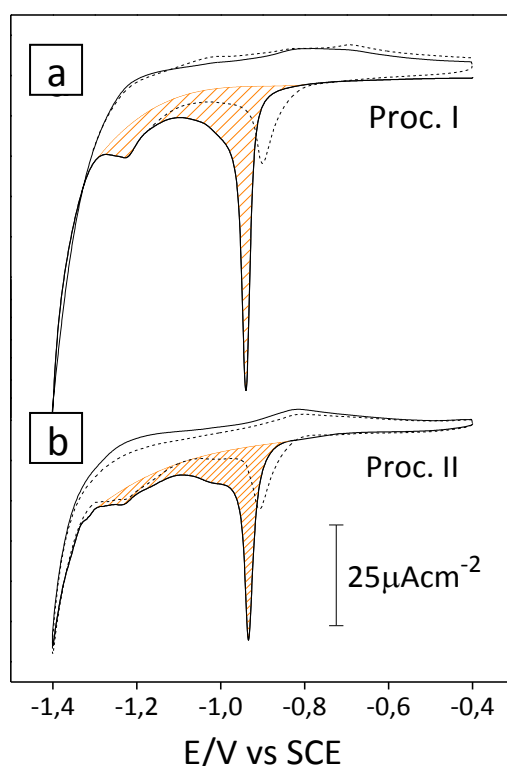


**Figura 3.21.** Espectros de XPS correspondiente a S 2p de SAMs de NdT sobre Au(111) preparadas por a) Proc. I y b) Proc. II.

Analizando la relación de las componentes a 162,0 eV y 163,5 eV, se puede decir que existe un predominio de la fase vertical respecto de la paralela para las SAMs de NdT. Sin embargo, en este caso el Proc. I aportaría mejores resultados para este alcanoditiol. Cabe destacar, que la presencia de la red  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° fue confirmada por imágenes de STM tomadas con anterioridad por Terán Arce *et al.*<sup>[54]</sup>

### 3.4.2 Butanoditiol

Finalmente resta analizar cuál es el comportamiento cuando la cadena hidrocarbonada es más corta que  $n = 6$ . La **Figura 3.22** muestra los voltamperogramas cíclicos para SAMs de 1,4-butanoditiol (BdT) preparadas mediante los Proc. I y II.

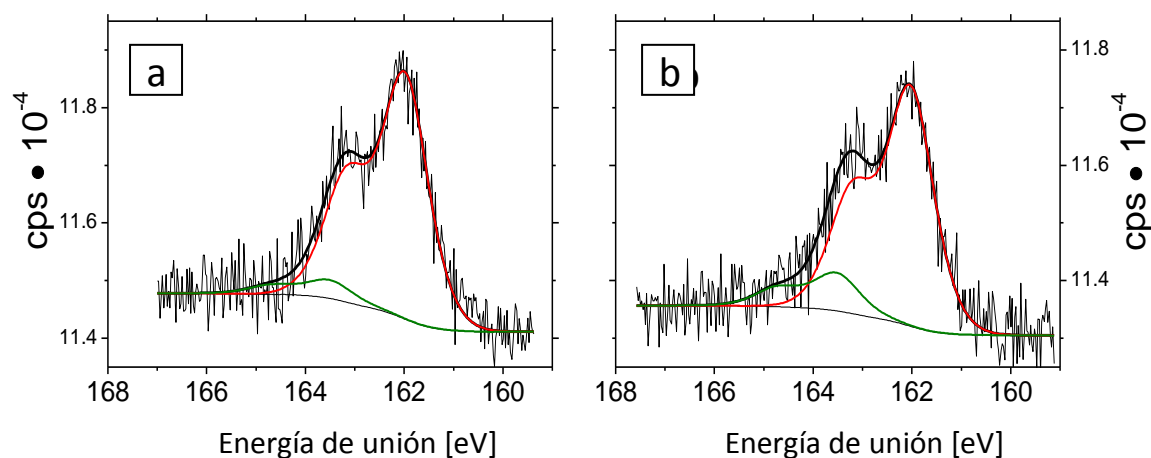


**Figura 3.22.** Voltamperogramas cíclicos de SAMs de BdT sobre Au(111) en solución de NaOH 0,1 M a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$  formadas mediante: a) Proc. I:  $t_i = 24 \text{ hs}$  en solución BdT 50  $\mu\text{M}$  en etanol absoluto y b) Proc. II:  $t_i = 1 \text{ h}$  en solución BdT 1 mM en *n*-hexano desoxigenado. Se muestran el primer (—) y segundo (····) ciclo en cada caso.

Los resultados son similares con ambos procedimientos, exhibiendo un  $E_p = -0,935 \text{ V}$  con un pequeño pico precediendo a la HER y una carga de  $79 \pm 10 \mu\text{C cm}^{-2}$  para Proc. I y  $q = 70 \pm 10 \mu\text{C cm}^{-2}$  para Proc. II. El valor de  $E_p$  es más negativo respecto a BT ( $-0,88 \text{ V}$ ) y no se

observa una readsorción significativa. En este caso, el cubrimiento teórico de la superficie es el mismo tanto para la fase vertical como para la fase paralela ya que el largo de cadena posibilita acomodar en los dos casos a los S en una red  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° (**Fig. 3.7b,c**). Por lo tanto, no es posible concluir a partir de estas medidas la configuración adoptada por las moléculas de BdT.

Recurrimos de nuevo a los espectros de XPS para establecer qué fase predomina en las SAMs de BdT (**Figura 3.23**). Conjuntamente con los resultados electroquímicos, ambos espectros presentan similares características. En primer lugar, la componente de 163,5 eV está muy disminuida siendo una evidencia directa de la ausencia de fase vertical, ya que todos los grupos -SH se encuentran quimisorbidos formando uniones tiolato (162 eV). Por otra parte, el cubrimiento estimado de la relación de señales S/Au es ligeramente menor respecto de los alcanotioles, indicando que la fase paralela no está densamente empaquetada.

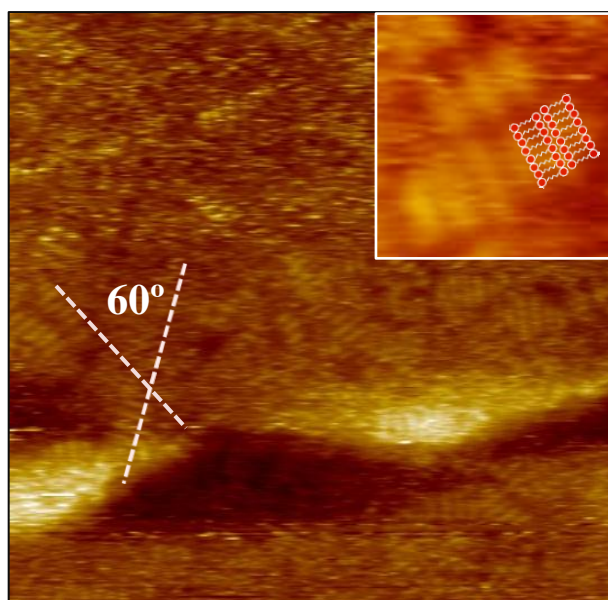


**Figura 3.23.** Espectros de XPS correspondientes a S 2p de SAMs de BdT sobre Au(111) preparadas por a) Proc. I y b) Proc. II.

Estas fases paralelas pudieron observarse por UHV-STM<sup>1</sup> en el Laboratorio de Colisiones Atómicas del CAB-CNEA con SAMs de BdT preparadas a partir del Proc. I (**Figura 3.24**). Se pueden apreciar arreglos de hileras de moléculas paralelas una al lado de otra, donde a su vez estas hileras presentan distintas orientaciones, de algún modo relacionadas

<sup>1</sup> El principio de operación de este microscopio es de semejantes características al empleado para las otras imágenes de STM de este capítulo excepto que se encuentra dentro de una cámara de vacío, donde se debe preingresar la muestra varias horas antes de la toma de imágenes.

con los planos (111) del sustrato de oro. Las zonas más brillantes corresponderían a las cabezas de S ubicadas lado a lado. Imágenes como la **Fig. 3.24** ya han sido informadas para fases paralelas de SAMs de HdT preparadas desde fase vapor,<sup>[51]</sup> así como también mediante STM in situ bajo control electroquímico durante la electrodesorción parcial de la SAM.<sup>[48]</sup>



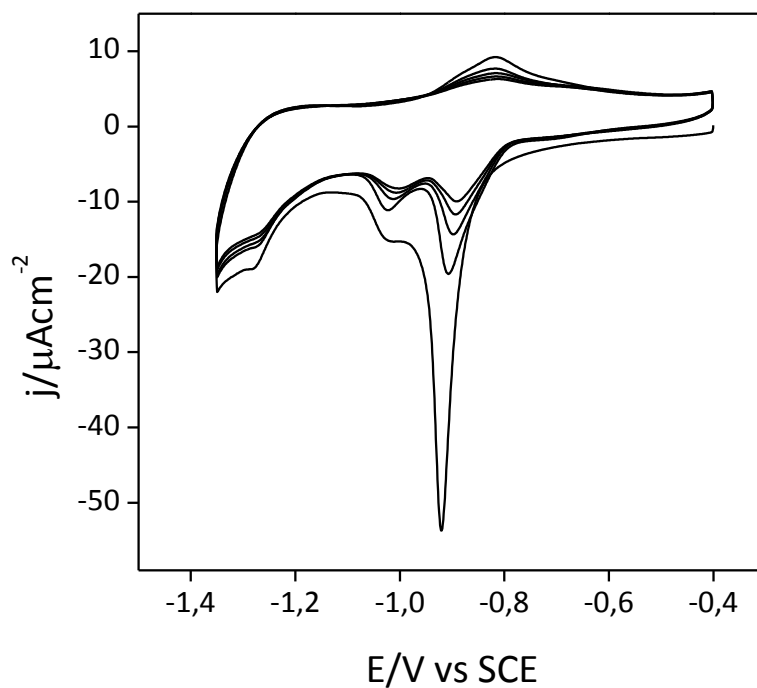
**Figura 3.24.** Imagen de UHV-STM de 50 nm x 50 nm de una SAM de BdT sobre Au(111) preparada por Proc. I. El recuadro de 7,5 nm x 7,5 nm muestra un detalle de los arreglos de moléculas paralelas.

### 3.5 Ditiotreitól

Finalmente, trataremos de optimizar la formación de SAMs de DL-ditiotreitól (DTT) en una fase puramente paralela. De este modo, sería posible que expusiera al entorno los grupos –OH (**Fig. 3.7a**) de manera de disponer de ellos en modificaciones posteriores, las cuales requieren de una superficie de características hidrofílicas. Tratándose de un derivado de 1,4-butanoditiol sería natural pensar que exhiba un comportamiento similar al BdT, sin embargo la presencia de funciones químicas en la cadena hidrocarbonada podría alterar tanto la cinética de formación como la configuración final adoptada.

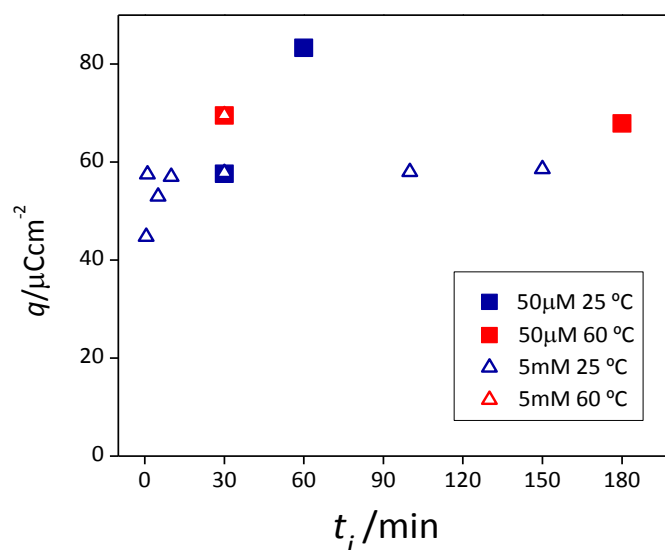
La **Figura 3.25** muestra un voltamperograma cíclico típico de la electrodesorción reductiva de una SAM de DTT. Se puede observar un pico principal con  $E_p = -0,92$  V, similar al hallado para BdT ( $-0,935$  V), seguido de un hombro desplazado a unos 0,1 V a valores más

negativos y un pequeño pico precediendo a la HER, tal como se observó para alcanotioles de cadena corta. Además, se puede apreciar que en los ciclados sucesivos el hombro tiene mayor persistencia respecto del pico principal.



**Figura 3.25.** Voltamperograma cíclico de una SAM de DTT sobre Au(111) en solución de NaOH 0,1M a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$  formada con  $t_i = 30 \text{ min}$  en una solución de DTT 5mM a  $60^\circ\text{C}$ .

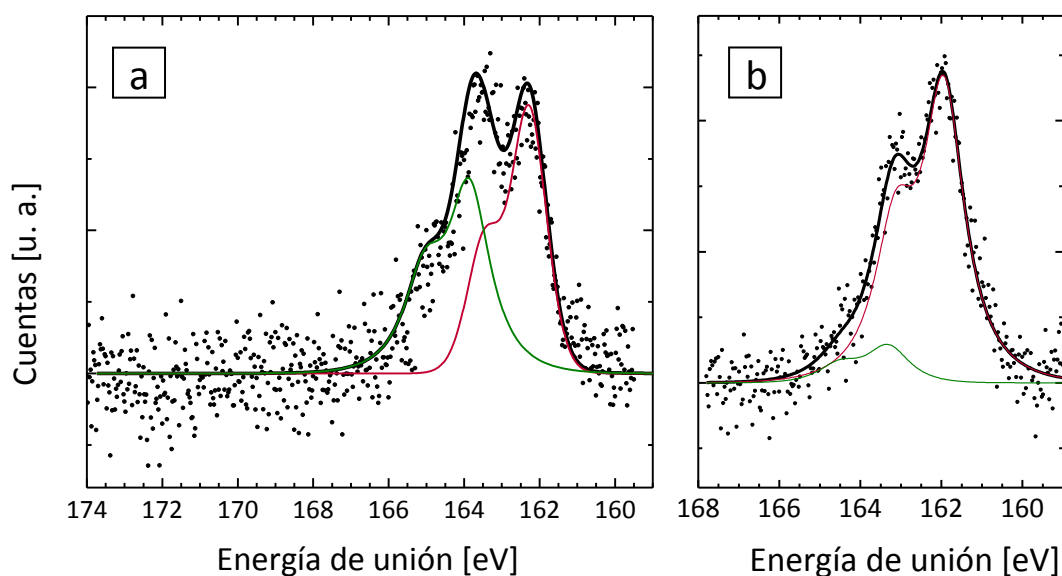
Para optimizar la formación de fases paralelas se emplearon distintos protocolos de preparación variando la concentración, la temperatura y el tiempo de inmersión. Su eficacia se evaluó calculando la carga de electrodeorción conjuntamente con medidas de los espectros de XPS correspondientes. La **Figura 3.26** resume los valores promedio de carga obtenidos para cada condición ensayada. La superficie alcanza rápidamente a  $T_{\text{amb}}$  un plateau con valores de  $q \approx 60 \mu\text{C cm}^{-2}$  independientemente de la concentración empleada para  $t_i < 60 \text{ min}$ . Teniendo en cuenta un arreglo de moléculas paralelas densamente empaquetadas con una distribución de S en  $\sqrt{3} \times \sqrt{3} \text{ R}30^\circ$  (**Fig. 3.7c**), se deberían obtener valores cercanos a  $\approx 74 \mu\text{C cm}^{-2}$  para alcanzar la saturación de la superficie. Empleando soluciones diluidas (50  $\mu\text{M}$ ) se alcanzan valores mayores con tiempos de inmersión largos,  $t_i > 60 \text{ min}$ . También es posible aumentar  $q$  calentando la solución a  $T = 60^\circ\text{C}$  durante la inmersión, tanto para soluciones diluidas como concentradas con  $t_i > 20 \text{ min}$ .



**Figura 3.26.** Cargas calculadas a partir de la desorción de SAMs DTT preparadas por distintos tiempos de inmersión, para concentraciones 50  $\mu$ M (cuadrados) y 5 mM (triángulos) y para temperaturas de 25 °C (azul) y 60 °C (rojo).

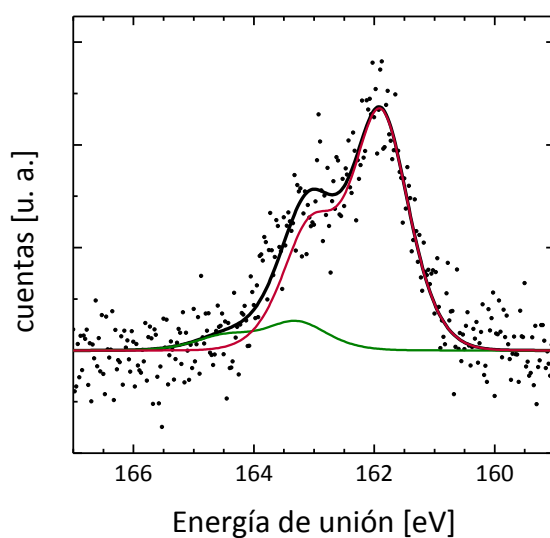
Aún para muestras con valores similares de carga, los espectros de XPS fueron disímiles respecto a la relación de componentes a 162,0 eV y 163,5 eV. Fue notable el hecho de que para estas SAMs el material fisisorbido requiere de un enjuague mucho más exhaustivo comparado con todos los anteriores tioles mencionados anteriormente, una característica que podría atribuirse a la posibilidad de los –OH de formar puentes de H. Hecha esta aclaración, cabe destacar que la componente a 163,5 eV es el valor final obtenido, el cual ya no se altera con posteriores enjuagues. La **Figura 3.27** muestra dos espectros característicos para las SAMs de DTT. En la **Fig. 3.27a** se puede observar que la componente a 163,5 eV, relacionada con grupo –SH libres, es considerable respecto a la componente en 162,0 eV mientras que en la **Fig. 3.27b** es prácticamente nula. Los protocolos de preparación en los cuales se obtuvieron espectros del tipo de la **Fig. 3.27a**, independientemente de la carga obtenida, deben descartarse ya que presentan una fracción de moléculas en fase vertical o bien moléculas fuertemente fisisorbidas, las cuales no pueden ser removidas por enjuague. De los protocolos que proporcionan espectros como los obtenidos en la **Fig. 3.27b**, debemos elegir entonces la condición que proporcione la mayor  $q$  posible, de modo de tener el mayor número de grupos –OH disponibles en la superficie. De ellas, el empleo de soluciones 5mM a  $T = 60$  °C con  $t_i > 20$  min resulta el mejor método de preparación.





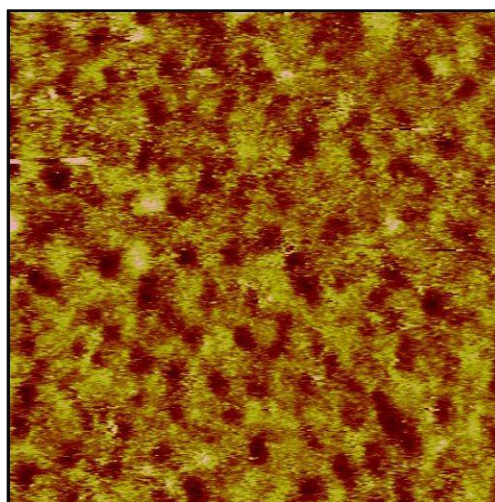
**Figura 3.27.** Espectros de XPS correspondiente a S 2p de SAMs de DTT sobre Au(111) preparadas con a)  $t_i = 30$  min DTT 5 mM 25 °C y b)  $t_i = 30$  min DTT 5 mM a 60 °C.

Ya que este tipo de SAMs se utilizará no sólo en superficies orientadas (111), se evaluó el protocolo de preparación seleccionado en sustratos de distinta rugosidad. La **Figura 3.28** muestra un espectro de XPS para un sustrato de oro policristalino (sin el procedimiento de recocido térmico) con una SAM de DTT preparada con el mismo procedimiento que en **Fig. 3.27b**. Se puede observar la ausencia de la componente a 163,5 eV, indicando que también en esta superficie se forma una capa de moléculas en fase paralela.



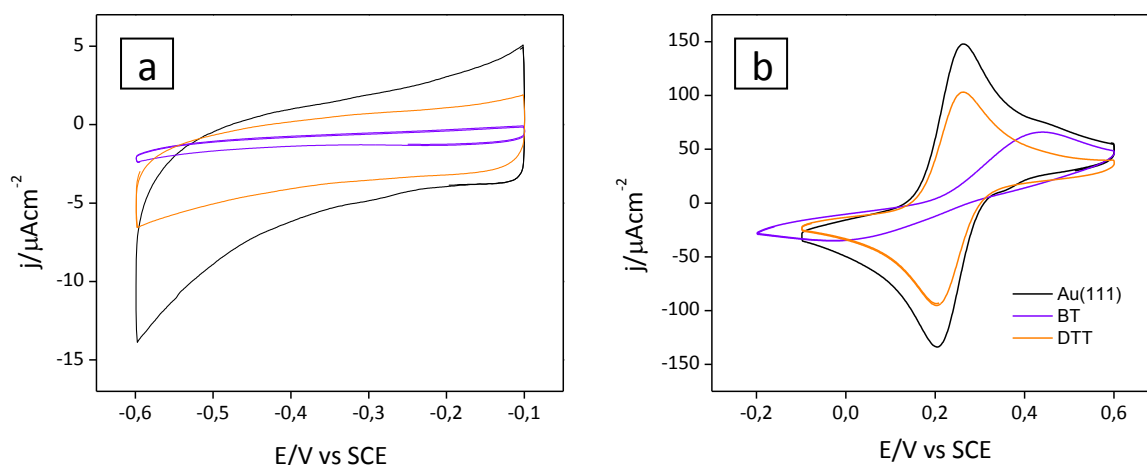
**Figura 3.28.** Espectro de XPS correspondiente a S 2p de SAMs de DTT sobre Au policristalino.

Se tomaron imágenes de las SAMs de DTT empleando tanto STM en aire como UHV-STM, pero en ningún equipo se logró obtener resolución molecular de modo de visualizar las fases paralelas como se logró para BdT (**Fig. 3.24**). La **Figura 3.29** muestra una imagen de STM donde se pueden observar numerosos pits, pero ningún arreglo periódico, ya sea porque las SAMs son altamente desordenadas o bien por la presencia de grupos –OH en la superficie.<sup>[38]</sup>



**Figura 3.29.** Imagen de STM de 75nm x 75nm de una SAM de DTT sobre Au(111) preparada por inmersión del sustrato durante 30min en solución etanólica 50  $\mu$ M a T = 60 °C.

Por último, analizaremos la capacidad de barrera que ofrecen las SAMs de DTT para el transporte de especies iónicas y para la transferencia de carga. La **Figura 3.30** muestra voltamperogramas cíclicos realizados en solución de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$  1 mM en KCl 1 M. Vemos que la SAM de DTT no tiene la cualidad aislante como la que proveen los alcanotioles, ya que el ancho de doble capa es más bien comparable al de la superficie de Au(111) sin modificar (**Fig. 3.30a**). A su vez, mientras que BT ejerce una barrera para la transferencia de carga de la cupla redox, el DTT es prácticamente “invisible” para la transferencia de carga del  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$  al sustrato de Au. Estos resultados están relacionados no sólo al desorden de las SAMs de DTT observado por STM sino también al escaso espesor ( $5,0 \pm 0,5 \text{ \AA}$ )<sup>[4]</sup> que poseen estas monocapas.

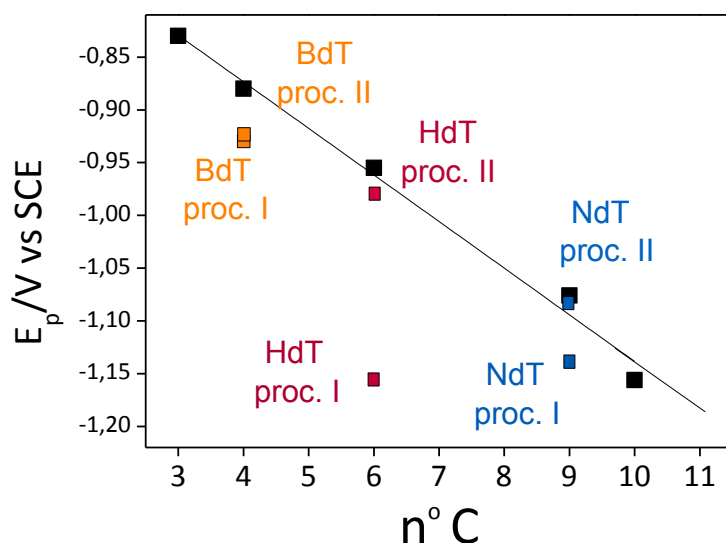


**Figura 3.30.** Voltamperogramas cíclicos en solución de  $\text{Fe(CN)}_6^{4-}$  1 mM en KCl 1 M a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . En negro aparece el Au(111), en naranja una SAM de DTT ( $t_f = 30 \text{ min}$  DTT 5 mM  $60^\circ\text{C}$ ) y en violeta una SAM de BT. Región de potenciales de a) doble capa eléctrica y b) de cupla redox.

### 3.6 Conclusiones

Los alcanotioles simples de largo de cadena  $n = 3 - 18$  forman SAMs densamente empaquetadas, ordenadas y reproducibles. La capacidad de la doble capa disminuye en todos los casos, siendo significativamente aislante para  $n > 9$ .

En el caso de los  $\alpha,\omega$ -alcanoditioles la configuración adoptada depende principalmente del largo de cadena. El nonanoditiol tiende a formar SAMs de fase vertical mientras que el butanoditiol tiende a formar fases paralelas, independientemente del protocolo de preparación. El hexanoditiol se encuentra en un comportamiento intermedio, donde el método de preparación incide sobre la reactividad del  $-\text{SH}$  terminal, evitando con el Proc. II la formación de multicapas. Los potenciales de desorción en todos los casos son mayores respecto a los alcanotioles de igual largo de cadena hidrocarbonada (**Figura 3.31**), indicando una mayor estabilidad de las SAMs ya sea por la unión de dos enlaces S-Au por molécula en el caso de las fases paralelas o bien por la interacción de un grupo extra en el caso de las fases verticales, con el caso extremo de la formación de una segunda capa en el caso del hexanoditiol mediante el Proc. I.



**Figura 3.31.** Gráfico de potencial de desorción en función del largo de cadena para SAMs de alcanoditioles preparados por los Proc. I y Proc. II. En negro se muestran los alcanotioles a modo de comparación.

El ditiotreitól muestra una tendencia a la formación de fases paralelas y se requiere de una preparación adecuada para aumentar la densidad de moléculas en la superficie sin generar fases verticales ni multicapas por la interacción puentes de hidrógeno entre las moléculas de DTT. La SAM formada es extremadamente permeable a los iones presentes en la solución y no dificulta la transferencia electrónica desde cuplas redox al sustrato.

### 3.7 Referencias

1. Hamilton, T. D.; MacGillivray, L. R. (2004) Self-Assembly in Biochemistry, in *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Taylor & Francis.
2. Adamson, A. W.; Gast, A. P. (1997) *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th ed., John Wiley & Sons, New York.
3. Bigelow, W. C.; Pickett, D. L.; Zisman, W. A. (1946) Oleophobic Monolayers. I. Films Adsorbed from Solution in Non-polar Liquids, *J. Colloid Interface Sci.* **1**, 513-538.
4. Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. (1983) Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 4481-4483.
5. Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. (2005) Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chem. Rev.* **105**, 1103-1170.
6. Ulman, A. (1996) Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, *Chem Rev* **96**, 1533-1554.
7. Poirier, G. E. (1997) Characterization of Organosulfur Molecular Monolayers on Au(111) using Scanning Tunneling Microscopy, *Chem. Rev.* **97**, 1117-1128.

8. Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C. (2010) Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system, *Chem. Soc. Rev.* 39, 1805-1805.
9. Torrelles, X.; Vericat, C.; Vela, M. E.; Fonticelli, M. H.; Daza Millone, M. A.; Felici, R.; Lee, T.-L.; Zegenhagen, J.; Muñoz, G.; Martín-Gago, J. A.; Salvarezza, R. C. (2006) Two-Site Adsorption Model for the ( $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ )-R30° Dodecanethiolate Lattice on Au(111) Surfaces, *J. Phys. Chem. B* 110, 5586-5594.
10. Schreiber, F. (2000) Structure and growth of self-assembling monolayers, *Prog. Surf. Sci.* 65, 151-257.
11. Schwartz, D. K. (2001) Mechanism and kinetics of self-assembled monolayer formation, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 52, 107-137.
12. Imabayashi, S. I.; Iida, M.; Hobara, D.; Feng, Z. Q.; Niki, K.; Kakiuchi, T. (1997) Reductive desorption of carboxylic-acid-terminated alkanethiol monolayers from Au(111) surfaces, *J. Electroanal. Chem.* 428, 33-38.
13. Kakiuchi, T.; Iida, M.; Imabayashi, S. I.; Niki, K. (2000) Double-layer-capacitance titration of self-assembled monolayers of  $\omega$ -functionalized alkanethiols on Au(111) surface, *Langmuir* 16, 5397-5401.
14. Azzaroni, O.; Vela, M. E.; Martin, H.; Hernández Creus, A.; Andreasen, G.; Salvarezza, R. C. (2001) Electrodesorption Kinetics and Molecular Interactions at Negatively Charged Self-Assembled Thiol Monolayers in Electrolyte Solutions, *Langmuir* 17, 6647-6654.
15. Sarathy, K. V.; Thomas, P. J.; Kulkarni, G. U.; Rao, C. N. R. (1999) Superlattices of Metal and Meta-Semiconductor Quantum Dots Obtained by Layer-by-Layer Deposition of Nanoparticle Arrays, *J. Phys. Chem. B* 103, 399-401.
16. Ohgi, T.; Sheng, H. Y.; Nejoh, H. (1998) Au particle deposition onto self-assembled monolayers of thiol and dithiol molecules, *Appl. Surf. Sci.* 130-132, 919-924.
17. Sakotsubo, Y.; Ohgi, T.; Fujita, D.; Ootuka, Y. (2005) Tunneling spectroscopy of isolated gold clusters grown on thiol/dithiol mixed self-assembled monolayers, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* 29, 601-605.
18. Sakotsubo, Y.; Ohgi, T.; Fujita, D.; Ootuka, Y. (2005) Growth and characterization of isolated nanoclusters on mixed self-assembled monolayers, *Appl. Surf. Sci.* 241, 33-37.
19. Ji, H.-F.; Zhang, Y.; Purushotham, V. V.; Kondu, S.; Ramachandran, B.; Thundat, T.; Haynie, D. T. (2005) 1,6-Hexanedithiol monolayer as a receptor for specific recognition of alkylmercury, *The Analyst* 130, 1577-1579.
20. Wang, R. Y.; Segalman, R. A.; Majumdar, A. (2006) Room temperature thermal conductance of alkanedithiol self-assembled monolayers, *Appl. Phys. Lett.* 89, 173113-173113.
21. Liang, J.; Rosa, L. G.; Scoles, G. (2007) Nanostructuring, Imaging and Molecular Manipulation of Dithiol Monolayers on Au(111) Surfaces by Atomic Force Microscopy, *The Journal of Physical Chemistry C* 111, 17275-17284.
22. Tai, Y.; Shaporenko, A.; Rong, H. T.; Buck, M.; Eck, W.; Grunze, M.; Zharnikov, M. (2004) Fabrication of Thiol-Terminated Surfaces Using Aromatic Self-Assembled Monolayers, *J. Phys. Chem. B* 108, 16806-16810.
23. Niklewski, A.; Azzam, W.; Strunskus, T.; Fischer, R. A.; Woll, C. (2004) Fabrication of Self-Assembled Monolayers Exhibiting a Thiol-Terminated Surface, *Langmuir* 20, 8620-8624.
24. Yang, Y.-C.; Lee, Y.-L.; Yang, L.-Y. O.; Yau, S.-L. (2006) In Situ Scanning Tunneling Microscopy of 1,6-Hexanedithiol, 1,9-Nonanedithiol, 1,2-Benzenedithiol, and 1,3-Benzenedithiol Adsorbed on Pt(111) Electrodes, *Langmuir* 22, 5189-5195.
25. Pasquali, L.; Terzi, F.; Zanardi, C.; Pigani, L.; Seeber, R.; Paolicelli, G.; Sutin, S. M.; Mahne, N.; Nannarone, S. (2007) Structure and properties of 1,4-benzenedimethanethiol films grown from solution on Au(111): An XPS and NEXAFS study, *Surf. Sci.* 601, 1419-1427.

26. Pasquali, L.; Terzi, F.; Zanardi, C.; Seeber, R.; Paolicelli, G.; Mahne, N.; Nannarone, S. (2007) Bonding and orientation of 1,4-benzenedimethanethiol on Au(111) prepared from solution and from gas phase, *J. Phys.: Condens. Matter* 19, 305020-305020.
27. Pasquali, L.; Terzi, F.; Seeber, R.; Doyle, B. P.; Nannarone, S. (2008) Adsorption geometry variation of 1,4-benzenedimethanethiol self-assembled monolayers on Au(111) grown from the vapor phase, *The Journal of Chemical Physics* 128, 134711-134710.
28. Kobayashi, K.; Horiuchi, T.; Yamada, H.; Matsushige, K. (1998) STM studies on nanoscopic structures and electric characteristics of alkanethiol and alkanedithiol self-assembled monolayers, *Thin Solid Films* 331, 210-215.
29. Kobayashi, K.; Umemura, J.; Horiuchi, T.; Yamada, H.; Matsushige, K. (1998) Structural Study on Self-Assembled Monolayers of Alkanedithiol Molecules, *Japanese Journal of Applied Physics* 37, L297-L299.
30. Akkerman, H. B.; Kronemeijer, A. J.; van Hal, P. A.; de Leeuw, D. M.; Blom, P. W. M.; de Boer, B. (2008) Self-Assembled-Monolayer Formation of Long Alkanedithiols in Molecular Junctions, *Small* 4, 100-104.
31. Aqua, T.; Cohen, H.; Vilan, A.; Naaman, R. (2007) Long-Range Substrate Effects on the Stability and Reactivity of Thiolated Self-Assembled Monolayers, *The Journal of Physical Chemistry C* 111, 16313-16318.
32. Kohli, P.; Taylor, K. K.; Harris, J. J.; Blanchard, G. J. (1998) Assembly of Covalently-Coupled Disulfide Multilayers on Gold, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 11962-11968.
33. Carot, M. L.; Esplandiu, M. J.; Cometto, F. P.; Patrio, E. M.; Macagno, V. A. (2005) Reactivity of 1,8-octanedithiol monolayers on Au(1 1 1): Experimental and theoretical investigation, *J. Electroanal. Chem.* 579, 13-23.
34. Käshammer, J.; Wohlfart, P.; Weiß, J.; Winter, C.; Fischer, R.; Mittler-Neher, S. (1998) Selective gold deposition via CVD onto self-assembled organic monolayers, *Opt. Mater.* 9, 406-410.
35. Esplandiu, M. J.; Carot, M. L.; Cometto, F. P.; Macagno, V. A.; Patrio, E. M. (2006) Electrochemical STM investigation of 1,8-octanedithiol monolayers on Au(1 1 1): Experimental and theoretical study, *Surf. Sci.* 600, 155-172.
36. Rieley, H.; Kendall, G. K.; Zemicael, F. W.; Smith, T. L.; Yang, S. (1998) X-ray Studies of Self-Assembled Monolayers on Coinage Metals. 1. Alignment and Photooxidation in 1,8-Octanedithiol and 1-Octanethiol on Au, *Langmuir* 14, 5147-5153.
37. Chah, S.; Fendler, J. H.; Yi, J. (2002) In-situ analysis of stepwise self-assembled 1,6-Hexanedithiol multilayers by surface plasmon resonance measurements, *Chem. Commun.*, 2094-2095.
38. MacDairmid, A. R.; Gallagher, M. C.; Banks, J. T. (2003) Structure of Dithiothreitol Monolayers on Au(111), *J. Phys. Chem. B* 107, 9789-9792.
39. Burshtain, D.; Mandler, D. (2006) The effect of surface attachment on ligand binding: studying the association of  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Sr^{2+}$  by 1-thioglycerol and 1,4-dithiothreitol monolayers, *PCCP* 8, 158-158.
40. Banks, J. T.; Yu, T. T.; Yu, H. Z. (2002) Direct Visualization of the Hydrolysis Kinetics of Titanium(IV) Alkoxides on Functionalized Gold Surfaces, *J. Phys. Chem. B* 106, 3538-3542.
41. Hamelin, A.; Sottomayor, M. J.; Silva, F.; Chang, S. C.; Weaver, M. J. (1990) Cyclic voltammetric characterization of oriented monocrystalline gold surfaces in aqueous alkaline solution, *J. Electroanal. Chem.* 295, 291-300.
42. Hamelin, A. (1996) Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 1. Behaviour at low-index faces, *J. Electroanal. Chem.* 407, 1-11.
43. Laredo, T.; Leitch, J.; Chen, M.; Burgess, I. J.; Dutcher, J. R.; Lipkowski, J. (2007) Measurement of the charge number per adsorbed molecule and packing densities of self-assembled long-chain monolayers of thiols, *Langmuir* 23, 6205-6211.

44. Walczak, M. M.; Alves, C. A.; Lamp, B. D.; Porter, M. D. (1995) Electrochemical and X-ray photoelectron spectroscopic evidence for differences in the binding sites of alkanethiolate monolayers chemisorbed at gold, *J. Electroanal. Chem.* **396**, 103-114.
45. Mohtat, N.; Byloos, M.; Soucy, M.; Morin, S.; Morin, M. (2000) Electrochemical evidence of the adsorption of alkanethiols on two sites on Ag(111), *J. Electroanal. Chem.* **484**, 120-130.
46. Vericat, C.; Benitez, G. A.; Grumelli, D. E.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. (2008) Thiol-capped gold: From planar to irregular surfaces, *Journal of Physics Condensed Matter* **20**.
47. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. (2001) *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
48. Esplandiú, M. J.; Hagenström, H.; Kolb, D. M. (2001) Functionalized Self-Assembled Alkanethiol Monolayers on Au(111) Electrodes: 1. Surface Structure and Electrochemistry, *Langmuir* **17**, 828-838.
49. Lindberg, B. J.; Hamrin, K.; Johansson, G.; Gelius, U.; Fahlman, A.; Nordling, C.; Siegbahn, K. (1970) Molecular Spectroscopy by Means of ESCA II. Sulfur compounds. Correlation of electron binding energy with structure, *Phys. Scr.* **1**, 286-298.
50. Cortés, E.; Rubert, A. A.; Benitez, G.; Carro, P.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. (2009) Enhanced Stability of Thiolate Self-Assembled Monolayers (SAMs) on Nanostructured Gold Substrates, *Langmuir* **25**, 5661-5666.
51. Leung, T. Y. B.; Gerstenberg, M. C.; Lavrich, D. J.; Scoles, G.; Schreiber, F.; Poirier, G. E. (2000) 1,6-Hexanedithiol Monolayers on Au(111): A Multitechnique Structural Study, *Langmuir* **16**, 549-561.
52. Ferreira, V. C.; Silva, F.; Abrantes, L. M. (2009) Electrochemical and STM study of  $\alpha,\omega$ -alkanedithiols self-assembled monolayers, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **23**, 99-106.
53. Hamoudi, H.; Guo, Z.; Prato, M.; Dablemont, C.; Zheng, W. Q.; Bourguignon, B.; Canepa, M.; Esaulov, V. A. (2008) On the self assembly of short chain alkanedithiols, *PCCP* **10**, 6836-6841.
54. Terán Arce, F.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C.; Arvía, A. J. (1997) Comparative study of thiol films on C(0001) and Au(111) surfaces by scanning probe microscopy, *Surf. Rev. Lett.* **4**, 637-649

# Capítulo 4

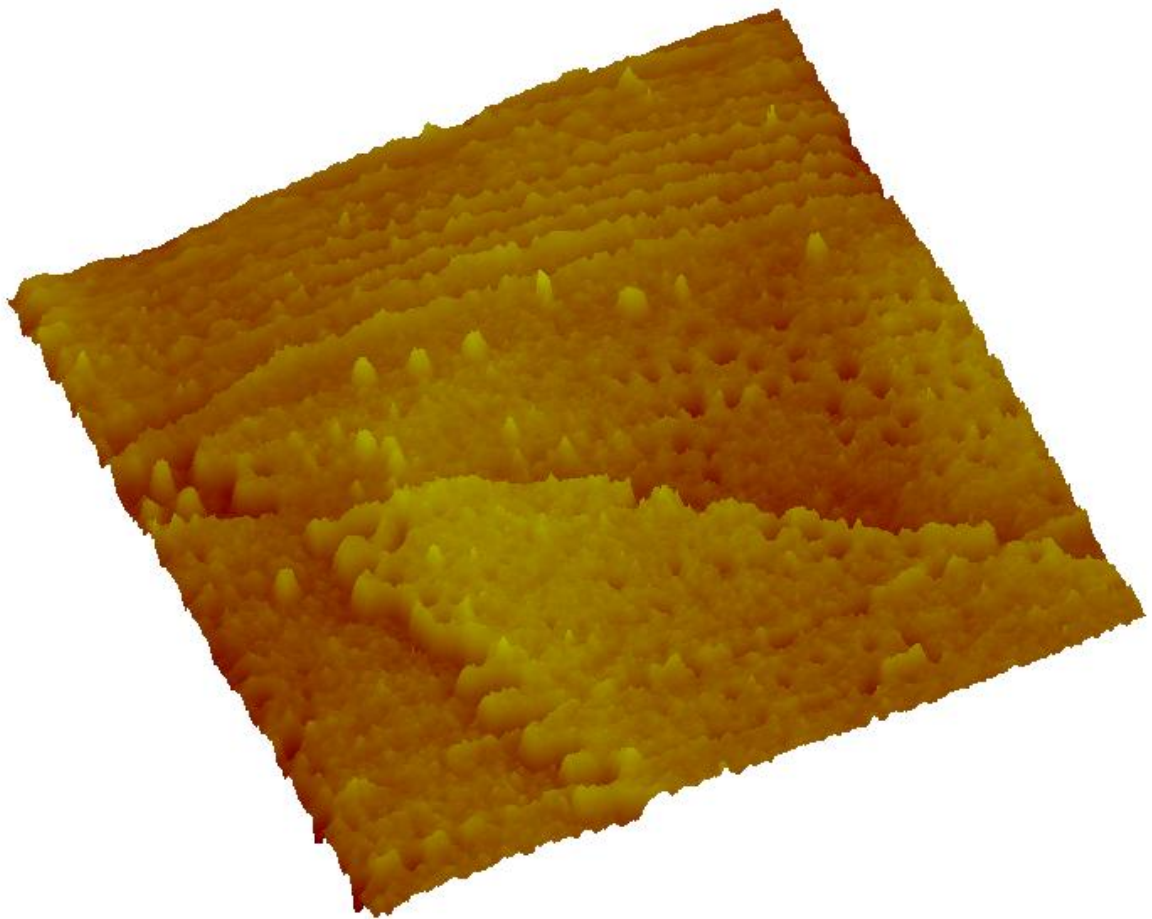
## Inmovilización de moléculas bioactivas sobre monocapas autoensambladas de alcanotioles

Se estudian la adsorción y permeabilidad de Azul de Metileno y Flavina Adenina Dinucleótido sobre sustratos de oro lisos y rugosos modificados con SAMs de alcanotioles de distintos largos de cadena y grupos funcionales.



*"Atraemos [...] por las cualidades que mostramos; retenemos por las cualidades que poseemos."*

Jean-Baptiste Antoine Suard



*"Should I stay or should I go"*

The Clash (1981)

## **4.1 Introducción**

Los sistemas biológicos, a través de selección natural, se han convertido en las más refinadas, eficientes y energéticamente económicas maquinarias nanométricas capaces de realizar los más diversos procesos. Es por ello que actualmente son fuente de inspiración para el desarrollo nanotecnológico de interruptores, cables, puertas lógicas, biosensores y receptores.<sup>[1]</sup> Un reto imperativo en la aplicación de este concepto es lograr una interfaz adecuada entre los procesos moleculares y los mesoscópicos, donde se incluyen cuestiones tales como la inmovilización, el orden y el direccionamiento.

En bioelectrónica, las moléculas biológicas se integran con elementos electrónicos para proporcionar dispositivos para biosensado, lecturas electrónicas de funciones biomoleculares, ensamblado de elementos de nanocircuitos o la conversión de procesos biocatalíticos en energía eléctrica.<sup>[1]</sup> Un paso crucial en todas estas aplicaciones es la transferencia de electrones desde y hacia la molécula biológica. Para ello debe existir una correcta ingeniería de la superficie de modo que haya una comunicación eléctrica entre el electrodo transductor y la biomolécula, preservando la integridad de la misma.

Las biomoléculas redox, entre las que podemos nombrar a las quinonas, flavinas, nicotinamidas y pterinas, están presentes en las células y tienen funciones en diversos procesos metabólicos. En particular, los cofactores se encuentran asociados fuertemente a los sitios activos de enzimas redox. Estas enzimas son capaces de regular y sintonizar con mucha precisión la actividad de estas moléculas orgánicas mediante enlaces débiles tales como puentes de hidrógeno, apilamiento  $\pi$  e interacciones electrostáticas, seleccionando su estado de oxidación y grado de protonación. Además, la arquitectura de la cadena peptídica de la enzima proporciona la presentación geométrica adecuada para el reconocimiento molecular y crea un entorno donde hay un aislamiento de interacciones indeseadas y concentraciones específicas de otros reactivos.

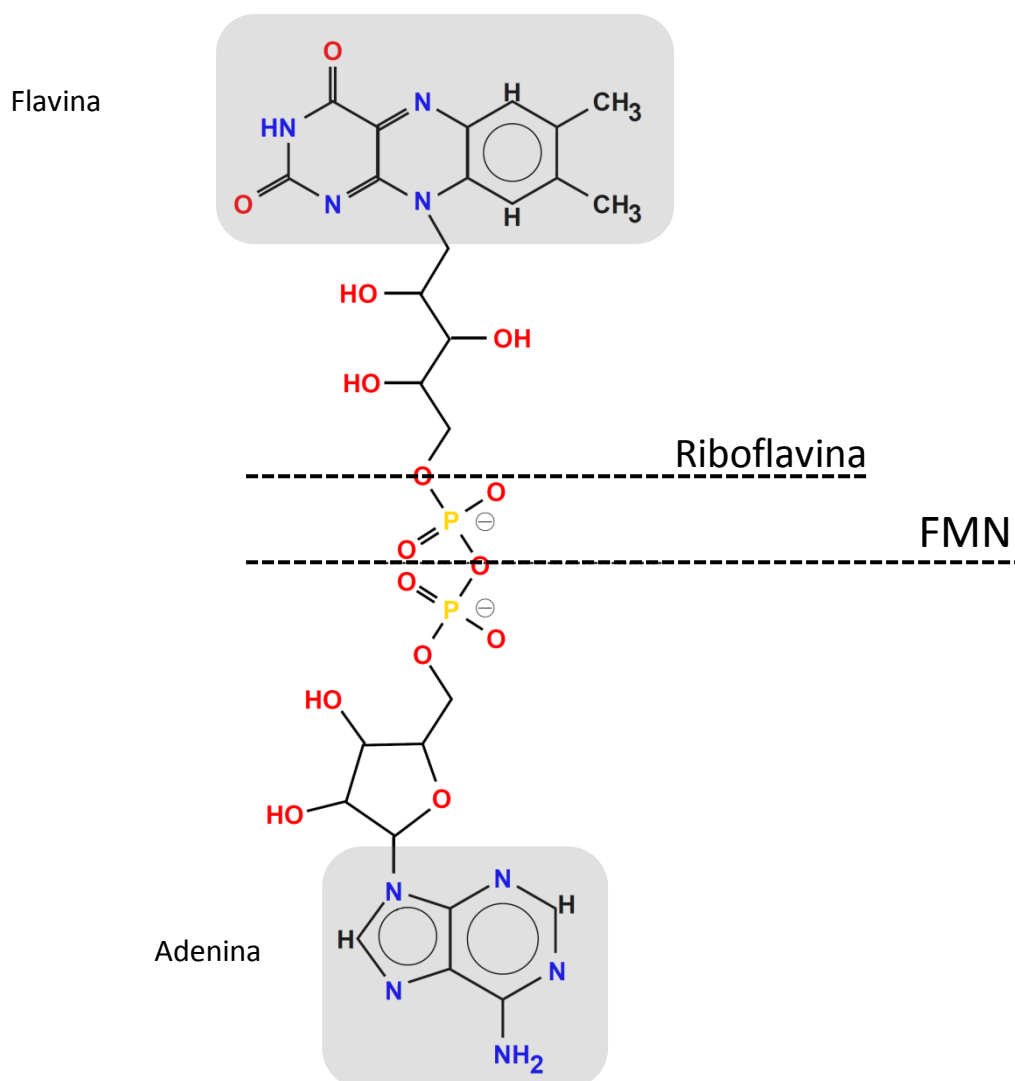
Si bien se ha aprendido mucho a través del estudio directo de sistemas biológicos, el uso de modelos confiere la capacidad de entender el comportamiento químico, ya que poseen el potencial de aislar y cuantificar interacciones específicas. En este aspecto, las SAMs de alcanotioles brindan uno de los modelos más sencillos para estudiar fenómenos tales como la transferencia transmembrana de electrones y la permeación selectiva de iones y moléculas. Además, las SAMs pueden exponer grupos funcionales capaces de

interactuar con residuos de las superficies de proteínas y enzimas.<sup>[2, 3]</sup> Dentro de las principales razones de la difusión de este modelo se encuentran la simplicidad en la fabricación y el orden en la estructura interfacial. Las SAMs controlan la naturaleza química de la interfaz electrodo-solución: la organización de la monocapa asegura un comportamiento cooperativo y homogéneo de toda la superficie del electrodo y su dimensión molecular impide la difusión lenta de las especies electroactivas hacia la superficie comparado con películas delgadas poliméricas, al mismo tiempo que reducen la acumulación de especies no deseadas en la superficie del electrodo. Incluso es posible diseñar la superficie de modo de modular la respuesta redox del cofactor,<sup>[4, 5]</sup> tal como lo haría una enzima.

#### **4.1.1 Flavina Adenina Dinucleótido**

El dinucleótido de Flavina-Adenina (FAD) es un cofactor, es decir, un compuesto biológico que está fuertemente asociado a una enzima, confiriéndole una actividad específica. Así, forma parte de numerosas reacciones del metabolismo de los seres vivos, como por ejemplo, en el transporte de electrones durante la respiración oxidativa que se lleva a cabo en la mitocondria.<sup>[6]</sup>

Podemos describir la molécula de FAD (**Figura 4.1**) en relación a su biosíntesis. La riboflavina o vitamina B2 es sintetizada por algunos organismos (los animales superiores la incorporan en la dieta) a partir del nucleótido guanosina 5'-trifosfato presente en el citosol, el cual mediante una serie de reacciones enzimáticas da origen al anillo de 7,8-dimetil-isoaloxazina o flavina.<sup>[7]</sup> La flavina (del latín *flavus*, amarillo) es considerada un pseudonucleótido y es la parte electroactiva del FAD. La riboflavina no tiene carga neta y es capaz de difundir a través de las membranas, aunque en general las células emplean transportadores para acelerar el proceso o llevarla en contra del gradiente de concentración.<sup>[8]</sup> Como estrategia de retención, las células añaden grupos fosfato con carga negativa para impedir la difusión transmembrana. Así, la fosforilación de la riboflavina con adenosina 5'-trifosfato (ATP) da origen a la flavina mononucleótido (FMN) liberando ADP. El FMN puede sufrir una segunda reacción con ATP dando origen al FAD mediante la liberación de un grupo pirofosfato.<sup>[9]</sup>

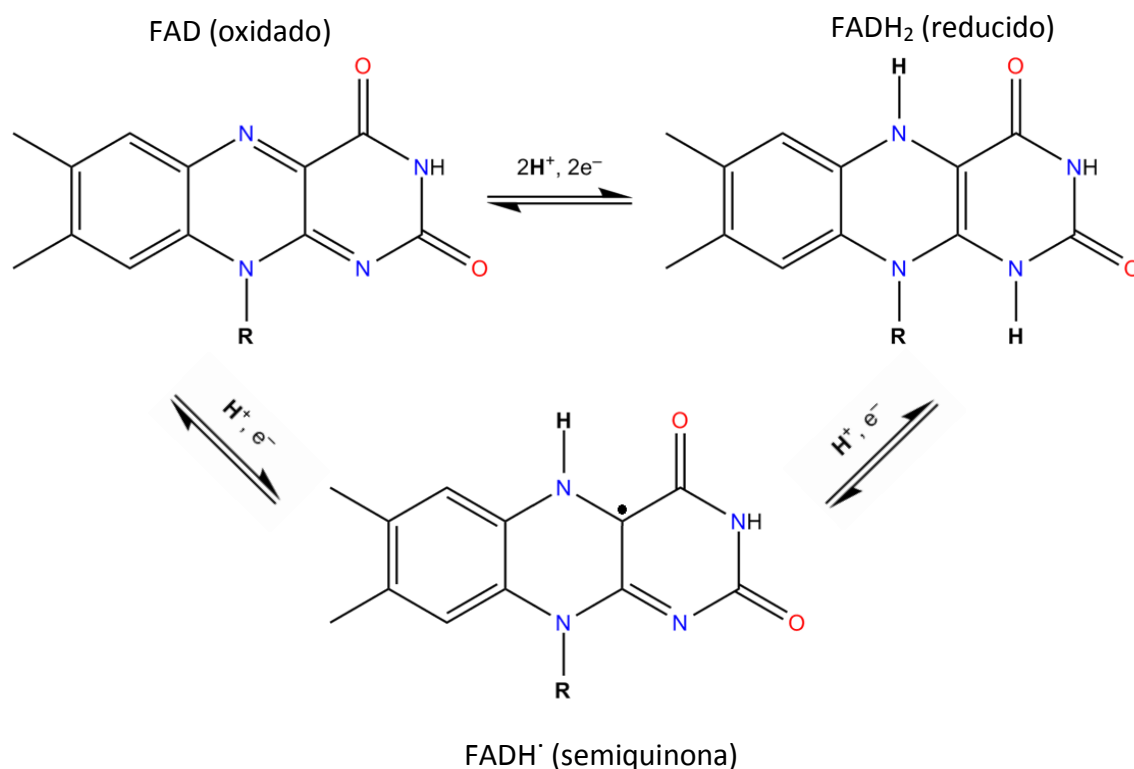


**Figura 4.1.** Esquema de una molécula de FAD. Con líneas punteadas se denota qué porción correspondería a la riboflavina y FMN. Sombreados en gris están los grupos flavina y adenina.

Las flavinas pueden experimentar una transferencia simultánea de dos electrones o bien dos transferencias secuenciales de un electrón (**Figura 4.2**), pasando por un estadio intermedio de radical semiquinona.<sup>[10]</sup> Los estados de oxidación son fácilmente identificables a partir de sus espectros UV-visible, siendo el FAD oxidado de un color amarillo intenso.<sup>[11]</sup>

El FAD está presente en una gran cantidad de enzimas redox y, en casi todos los casos, permanece fuertemente unido al interior de la proteína. El potencial electroquímico,  $E_0$ , entre FAD libre y FADH<sub>2</sub> libre en condiciones fisiológicas es de -0,219 V vs SHE.<sup>[12]</sup> No obstante, dependiendo de la estructura de la enzima y el ambiente químico del sitio activo, el  $E_0$  puede variar de -0,490 a 0,190 V,<sup>[10]</sup> lo que permite su participación en las distintas variedades de reacciones. Este amplio rango de potencial se debe al grado de conjugación

relativo entre los residuos aromáticos y el sistema  $\pi$  del grupo flavina.<sup>[6]</sup> La estabilización relativa del FADH<sub>2</sub> respecto del FAD tiende a aumentar  $E_0$  y viceversa.



**Figura 4.2.** Estados de oxidación de las flavinas. R representa a los distintos residuos según sea riboflavina, FMN o FAD.

Si se desea emplear el FAD en aplicaciones del campo de la bioelectrónica, se debe elegir una técnica de inmovilización apropiada. El FAD puede adsorberse sobre superficies metálicas como Au,<sup>[13, 14]</sup> Pt,<sup>[13]</sup> Hg<sup>[15-17]</sup> y Ti<sup>[18]</sup> o no metálicas como HOPG,<sup>[13, 19]</sup> GCE,<sup>[13, 19, 20]</sup> fibras de carbón recubiertas de TiO<sub>2</sub><sup>[20]</sup>, ZnO<sup>[21]</sup> y ZrO<sub>2</sub><sup>[21, 22]</sup> por interacción principalmente de los anillos de la adenina y/o flavina. En medios acuosos se puede observar una cupla redox reversible dependiente del pH, ya que la transferencia de electrones está acoplada a la de protones.<sup>[23]</sup> Si bien la molécula es estable adsorbida en estas superficies, se mantiene unida por interacciones débiles, por lo que puede ser fácilmente removida al exponerse a un electrolito. Existen estrategias de inmovilización covalente por las cuales se puede unir la molécula completa<sup>[24, 25]</sup> o bien solamente el grupo flavina.<sup>[26]</sup> Estos métodos son los más empleados para aplicaciones donde la prioridad es retener el material activo, aunque implica un cambio en las propiedades fisicoquímicas y de transferencia de carga respecto de la molécula libre. El entorno óptimo para el funcionamiento del FAD es naturalmente el

proporcionado por las enzimas, la amplia familia de flavoproteínas, que inmovilizan al FAD mediante enlaces débiles. Por lo tanto, otra metodología está constituida por la inmovilización de flavoenzimas en los electrodos. Sin embargo, no es sencillo confinar macromoléculas que dependen de su arreglo tridimensional en superficies bidimensionales sin que sufran procesos de desnaturalización parcial. Uno de los ejemplos más exitosos es el de la glucosa oxidasa,<sup>[27]</sup> que se emplea para biosensores de glucosa portátiles de suma importancia para aquellos que padecen diabetes.

La interacción del FAD por enlaces débiles en sistemas modelo como los proporcionados por SAMs de alcanotioles proveería un modo sencillo para estudiar procesos de transferencia de carga, de interacción con grupos funcionales y de permeabilidad en un ambiente controlado en relación a sus propiedades como mediador redox.

#### **4.1.2 Azul de metileno**

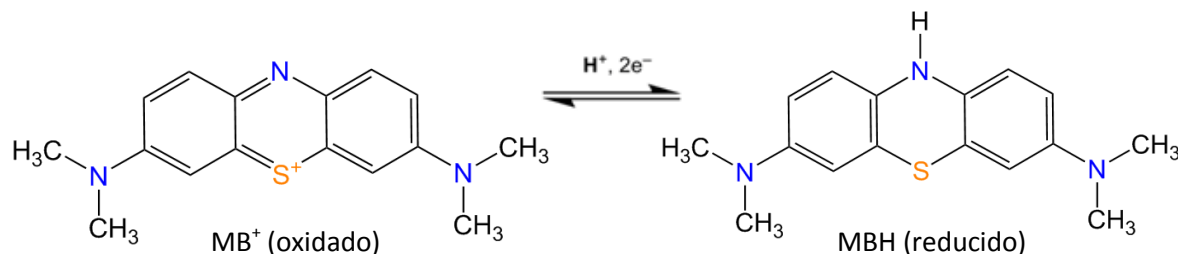
El azul de metileno (MB) es un colorante miembro de la familia de las tiazinas, fabricado por primera vez en 1876 por Heinrich Caro, quien desarrolló la síntesis para la compañía alemana BASF, dedicada por ese entonces a la industria textil.<sup>1</sup> Sin embargo, no tardó en emigrar al campo de la medicina en la nascente rama de la bacteriología. Uno de sus primeros usos fue en la tinción de microorganismos que permitió a Robert Koch visualizar al bacilo de la tuberculosis.<sup>[28]</sup> En 1891, se convirtió en el primer compuesto sintético en ser usado como droga, cuando Paul Guttman y Paul Ehrlich lo utilizaron para el tratamiento contra la malaria,<sup>[29]</sup> introduciendo el concepto moderno de quimioterapia dirigida a un blanco. Hoy en día tiene numerosas y variadas aplicaciones relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas, que van además de su uso tradicional como colorante a indicador redox en química analítica, fármaco para el tratamiento de metahemoglobinemia, marcador de tumores, fungicida, sensor óptico de oxígeno y como fotosensibilizador para crear oxígeno singlete en terapia fotodinámica para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.<sup>[30, 31]</sup>

El MB se prepara por reacción de N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina con sulfuro de hidrógeno y cloruro férrico.<sup>[32]</sup> El átomo de azufre hace un puente entre las dos moléculas de

---

<sup>1</sup> Extraído de la Historia de la compañía BASF disponible en:  
<http://www.basf.com/group/corporate/en/about-basf/history/1865-1901/index>

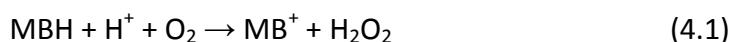
fenilendiamina formando una fenotiazina que es oxidada por el  $\text{Fe}^{3+}$  en el catión tionio (**Figura 4.3**). El potencial redox del MB es de 0,011 V vs SHE a pH = 7,<sup>[12]</sup> siendo cercano al de la mayoría de las biomoléculas. La forma oxidada ( $\text{MB}^+$ ) es de color azul mientras la forma reducida (MBH) es incolora.



**Figura 4.3.** Esquema de la molécula de MB en su estado oxidado ( $\text{MB}^+$ ) y reducido (MBH).

Se pueden encontrar algunas similitudes entre el MB y el grupo flavina, como la geometría y el proceso de reducción que involucra 2 electrones acompañado por la hidrogenación del nitrógeno central. De hecho, algunas flavoenzimas son capaces de utilizarlo como sustrato.<sup>[33]</sup>

Debido a su actividad antitumoral y antimalarial, existe un creciente interés en estudiar el mecanismo de incorporación del MB en las células así como distintas estrategias de encapsulamiento y liberación. En condiciones fisiológicas, el MB se encuentra oxidado, sin embargo, es la forma reducida (MBH) la que posee actividad farmacológica según la reacción (4.1):



Aunque está confirmada la reducción enzimática del MB, es todavía materia de discusión la localización de esta actividad (extracelular, intracelular o ambas).<sup>[33]</sup> El MBH tiene un carácter más lipofílico, siendo soluble en *n*-dodecano mientras que el  $\text{MB}^+$  no lo es.<sup>[34]</sup> De este modo, sería la especie reducida la candidata a difundir a través de la membrana celular. No obstante, es posible observar incorporación de MB en células donde la actividad reductasa no está presente,<sup>[35]</sup> en organelas<sup>[36]</sup> e incluso en sistemas modelo de membranas.<sup>[37]</sup> Por lo tanto, ambas especies tienen capacidad de difundir, contando cada una con su propia velocidad de incorporación.

Resulta interesante estudiar la interacción del MB con SAMs de alcanotioles tanto como para comprender qué procesos ocurren en la permeación a través de las membranas lipídicas como para estudiar qué tipo de estrategias de inmovilización y liberación deberían utilizarse para su administración en terapia fotodinámica.

#### **4.1.3 Objetivos del presente capítulo**

Evaluar mediante el uso de técnicas electroquímicas distintas estrategias de inmovilización de MB y FAD sobre sustratos de oro de distinta rugosidad modificados o no con SAMs de alcanotioles. Estudiar la permeabilidad a través de la cadena hidrocarbonada empleando alcanotioles de distinto largo de cadena y la interacción con grupos hidrofóbicos ( $-\text{CH}_3$ ) o hidrofílicos ( $-\text{OH}$ ). Analizar la influencia de la rugosidad del sustrato de oro en las SAMs e implementar su uso para estudios por SERS.

### **4.2 Experimental**

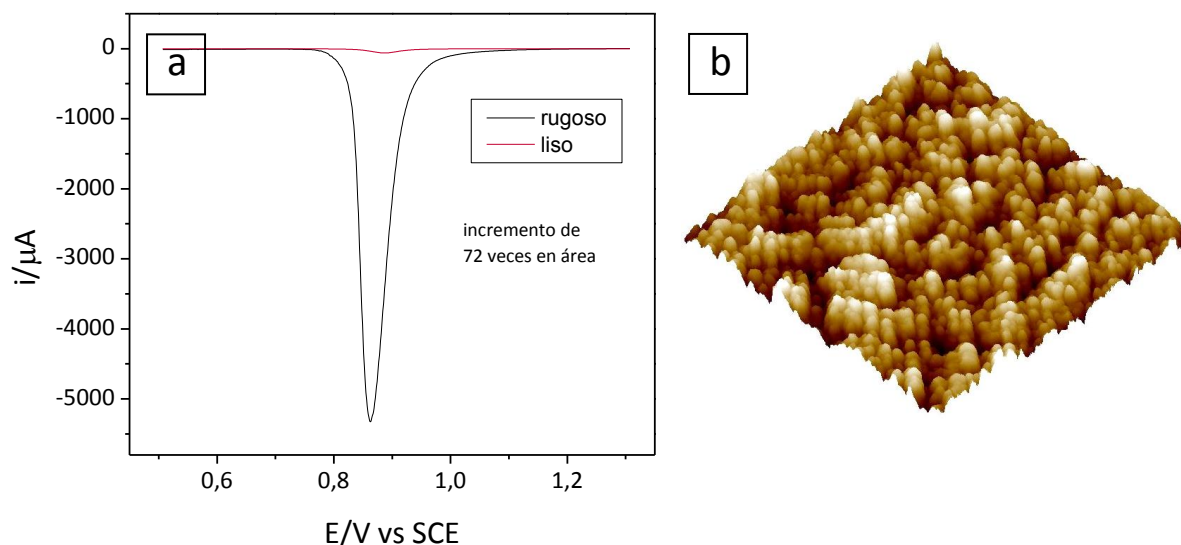
#### **4.2.1 Sustratos de oro**

Se utilizaron películas delgadas de Au evaporado sobre vidrio borosilicato “Robax” provistas por la firma Arrandee® de Werther, Alemania. Estas placas de oro se sometieron a un tratamiento térmico con llama de gas butano o hidrógeno para obtener la orientación preferencial (111), como ya se describió en el Capítulo 3 (sección 3.2.1).

Para estudios de espectroscopía Raman amplificada por superficies (SERS), se emplearon sustratos de oro nanoestructurados preparados en el laboratorio mediante un método electroquímico.<sup>[38]</sup> Se utilizaron láminas de oro de 0,5 mm x 1 mm con 99,99 % de pureza, cuyas superficies se limpiaron por pulido y posterior sonicación. Las láminas se sumergieron en una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M y se ciclaron a  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$  hasta obtener un voltamperograma correspondiente a una superficie limpia.<sup>[39]</sup> Luego, se aplicó un potencial de 2,4 V vs SCE durante 15 min, generándose una película gruesa de óxido de oro hidratado. Enseguida, se llevó a cabo una reducción lenta llevando el potencial a -0,6 V a una velocidad de  $0,025 \text{ Vs}^{-1}$  y se mantuvo este potencial durante 5 min. El pico de reducción del óxido de oro del voltamperograma final se comparó con el inicial para determinar el incremento en



área (**Figura 4.4a**), que en promedio fue de 70 veces el área inicial. Las imágenes de STM de la superficie revelan nanoestructuras alargadas de Au de 10 a 20 nm de diámetro (**Fig. 4.4b**).



**Figura 4.4.** a) Voltamperogramas cíclicos de Au antes y después del tratamiento de rugosado electroquímico en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5M a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . b) Imagen de STM de 600 nm x 600 nm de la superficie de Au rugosada ( $Z = 75 \text{ nm}$ ).

#### 4.2.2 Reactivos

Se compró Flavina Adenina Dinucleótido (FAD) como sal disódica 95% marca Sigma y cloruro de Azul de Metileno (MB) marca Merck (grado Reag. Ph Eur). Las sales  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  99% y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  99% se compraron marca Sigma. Los alcanotioles 1-Propanotiol (PT) 99%, 1-butanotiol (BT) 99%, 1-hexanotiol (HT) 95%, 1-nonanotiol (NT) 95% y 1-dodecanotiol (DDT) 98% se compraron marca Sigma y Fluka. El DL-ditiotreitol (DTT) 99% se compró marca Sigma. Todos estos tioles se emplearon sin ninguna purificación adicional. El resto de los reactivos y solventes empleados fueron del mejor grado analítico disponible. Para las soluciones acuosas se empleó siempre agua MilliQ (18,2 MΩ).

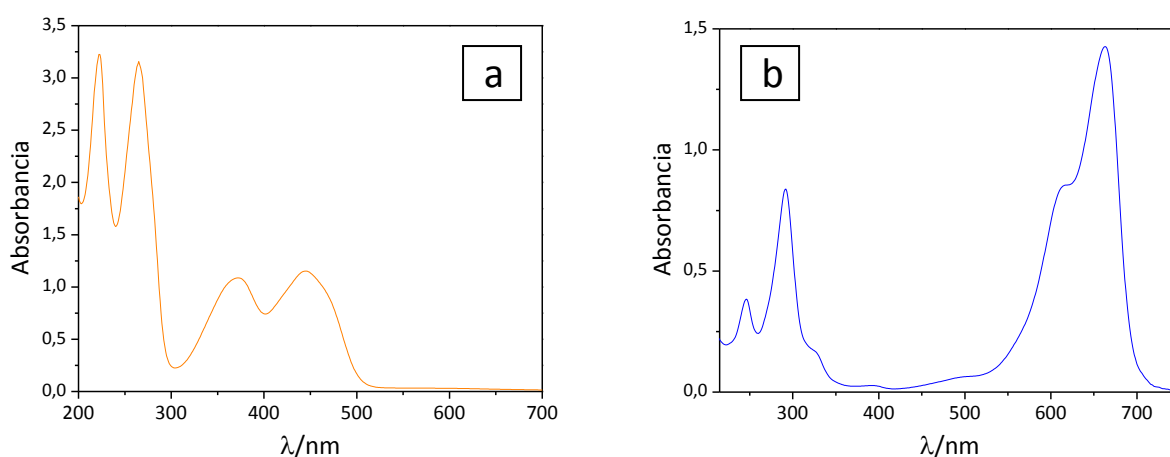
#### 4.2.3 Preparación de SAMs

Las SAMs de alcanotioles se formaron por inmersión de los sustratos de oro en soluciones etanólicas 50  $\mu\text{M}$  durante 24 hs en ausencia de luz. Después de este periodo, se las enjuagó con abundante etanol absoluto. Los restos de solvente se removieron por secado

en un flujo de  $N_2$ . En algunos casos, se emplearon tiempos de inmersión cortos ( $t_i = 1-30$  min) para obtener SAMs con abundantes defectos.

#### 4.2.4 Inmovilización de biomoléculas

Se prepararon soluciones acuosas 100  $\mu M$  de MB y FAD a partir de las drogas puras en agua MilliQ. Se verificó la calidad de las soluciones antes de su uso mediante los espectros UV-visible (**Figura 3.5**) tomados con un equipo Perkin-Elmer. Las soluciones de FAD muestran el espectro típico de la molécula oxidada y fueron estables durante meses. Las soluciones de MB se diluyeron antes de medir debido a su alto coeficiente molar de extinción para la forma oxidada ( $MB^+$ ). En este caso, las soluciones se prepararon periódicamente ya que en concentraciones mayores a 100  $\mu M$  está descripta la formación de dímeros.<sup>[36]</sup>



**Figura 3.5.** Espectros UV-visible de a) una solución 100  $\mu M$  de FAD y b) una solución de MB 10  $\mu M$  en agua MilliQ.

La inmovilización de las biomoléculas se llevó cabo mediante inmersión de los sustratos de oro, con o sin la presencia de SAMs, en soluciones acuosas 100  $\mu M$  durante distintos períodos de tiempo. Luego de la inmersión se realizaron enjuagues con abundante agua MilliQ y se secaron en una corriente de  $N_2$  previo a las medidas.

#### 4.2.4 Medidas electroquímicas

Las medidas de voltamperometría cíclica se realizaron con un potenciostato con capacidad de adquisición digital de datos. Se empleó una celda electroquímica de vidrio de tres electrodos. Como electrodos de referencia se utilizaron electrodos de calomel saturado

(SCE) y de Ag/AgCl preparados en el laboratorio. El contraelectrodo fue una placa de Pt de gran área y los electrodos de trabajo, los sustratos de Au modificados con biomoléculas. Como soluciones electrolíticas se emplearon NaOH 0,1 M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M y buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 y 7,4, todas desoxigenadas mediante burbujeo de N<sub>2</sub> antes de medir. El buffer fosfato se preparó mediante disolución de igual cantidad de las sales Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O en agua MilliQ y ajustando el pH con NaOH concentrado.

Todas las medidas están expresadas en densidad de corriente (*j*) respecto del área electroquímica de los sustratos de Au, calculada a partir del pico de reducción del óxido de oro.<sup>[40]</sup> Los voltamperogramas cíclicos que se muestran son representativos del comportamiento observado mientras que los datos de densidad de carga son resultado del promedio de al menos 10 medidas independientes.

#### **4.2.5 Medidas de SERS**

Se hicieron medidas de Raman ex situ e in situ en un espectrómetro triple Jobin–Yvon T64000 operando en modo sustractivo y equipado con un dispositivo acoplado para enfriamiento con N<sub>2</sub> líquido. Los sustratos modificados se excitaron con un laser de iones Ar-Kr empleando energías entre 1,834 eV (676 nm) y 2,707 eV (458 nm). Típicamente se usaron potencias de 10mW concentradas en una línea de foco de 7 mm de largo y ~ 100 μm de profundidad para evitar la degradación de las muestras inducida por fotones. Esta degradación (*photobleaching*) fue siempre < 5 % después de 100 s de adquisición de datos. Para evitar la acumulación de este efecto, se tomaron espectros en diferentes zonas de la muestra. Además, antes de cada medida se hicieron mapas espectrales de toda la superficie con bajas potencias y tiempos cortos de adquisición para excluir zonas de intensidades Raman demasiado distintas al valor promedio.

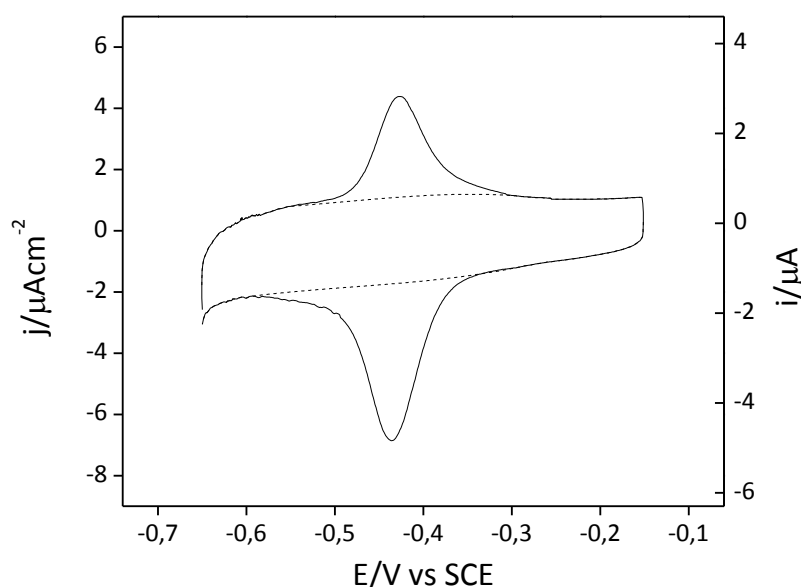
#### **4.2.5 Medidas de STM**

Las medidas de STM ex situ se realizaron con un microscopio modelo Nanoscope IIIa, de la marca Digital Instruments Inc. (Santa Barbara, California). Las medidas se realizaron en general con *scanners* que permiten barrer un campo máximo de unos 10 μm. Se emplearon puntas comerciales de Pt/Ir (Nanoprobe™ STM tips) de 8 mm de largo y 0,25 mm de diámetro que fueron limpiadas con corriente de nitrógeno antes de su uso. En cuanto al

modo de operación del STM, todas las imágenes que se muestran en este trabajo han sido tomadas en el modo de corriente constante. En general se usaron voltajes túnel  $V_T$  positivos entre 0,03 y 1,2 V. Las corrientes habituales eran 0,5 - 1 nA. El programa de análisis de las imágenes fue el provisto por la empresa fabricante del microscopio (versión 5.30).

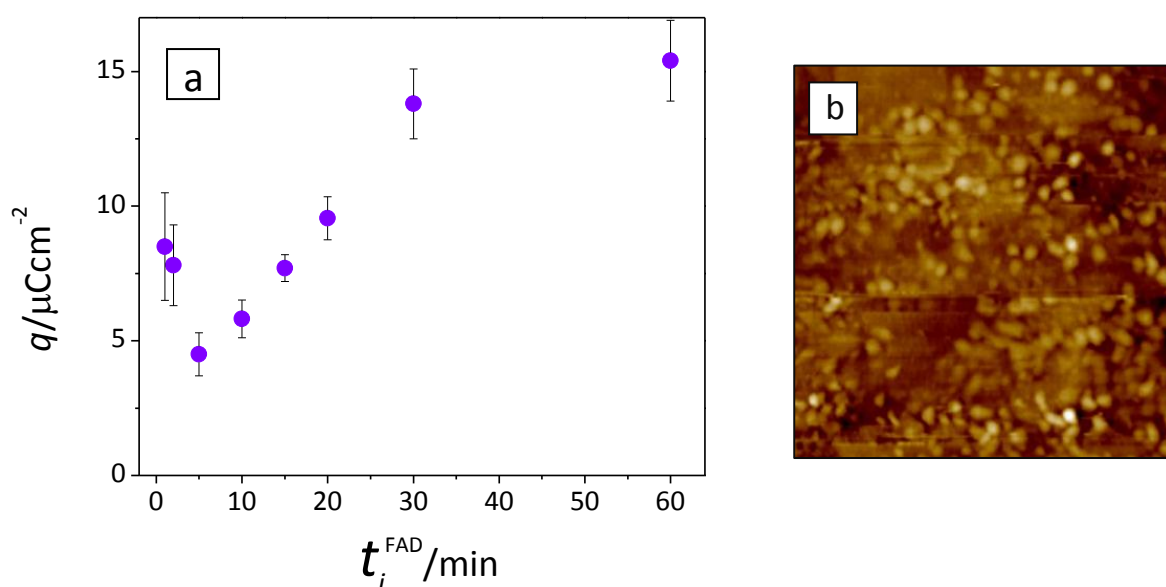
### 4.3 Flavina Adenina Dinucleótido

El FAD puede ser inmovilizado sobre oro por simple inmersión de los sustratos en una solución acuosa 100  $\mu\text{M}$ . La **Figura 4.6** muestra el voltamperograma cíclico de un sustrato de Au(111) después de 15 min de inmersión en solución de FAD. Se puede observar una cupla redox reversible a  $E_p^{1/2} = -0,43 \text{ V}$ , que involucra una carga de reducción de  $7,7 \mu\text{C cm}^{-2}$  y una carga de oxidación de  $4,7 \mu\text{C cm}^{-2}$ . La diferencia entre las áreas del pico catódico y del pico anódico (las cuales deben ser iguales idealmente) puede estar relacionada con la debilidad de la adsorción de las especies tanto oxidada como reducida.<sup>[41]</sup> Por lo tanto, a fines de comparar la carga para distintos tiempos de inmersión, se tendrá en cuenta ya sea sólo la carga anódica o sólo la catódica.



**Figura 4.6.** Voltamperograma cíclico de FAD inmovilizado sobre un sustrato de Au(111) realizado en buffer fosfato 0,1 M pH = 7,0 a una  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . Se muestran punteadas las líneas de base para el cálculo de la carga.

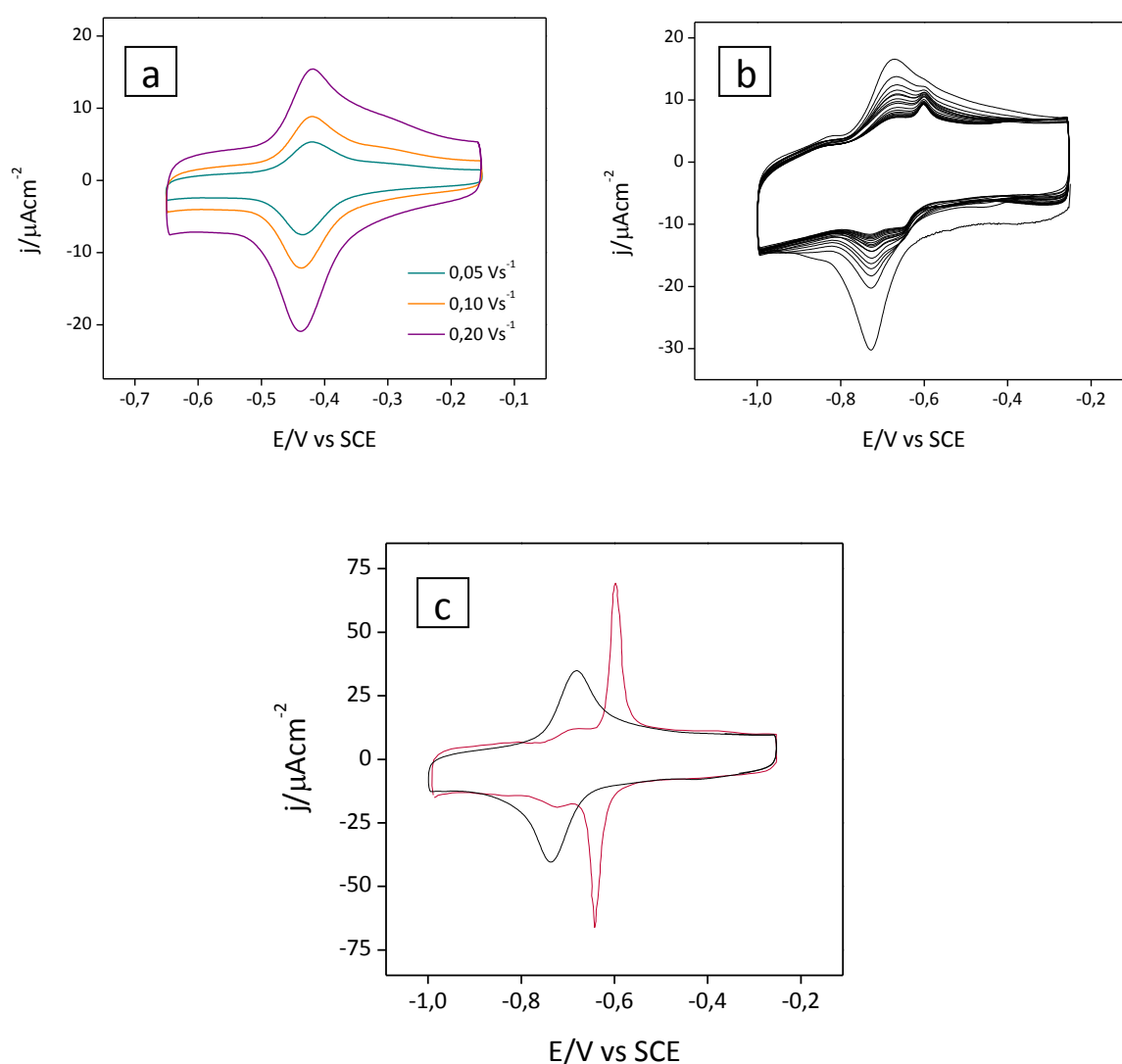
Estudios sobre electrodos de Hg con soluciones de FAD 2  $\mu\text{M}$  a  $\text{pH} = 7,0$ <sup>[17]</sup> estiman una carga anódica de saturación de  $\sim 9 \mu\text{C cm}^{-2}$  para la molécula plegada en sí con ambos grupos adenina y flavina paralelos a la superficie ( $3,70 \text{ nm}^2$  de área por molécula) y de  $\sim 14 \mu\text{C cm}^{-2}$  para ambos grupos perpendiculares ( $2,40 \text{ nm}^2$  de área por molécula). Siguiendo la variación de carga del pico anódico en función del tiempo de inmersión (**Figura 4.7a**), se puede observar que para tiempos cortos ( $t_i^{\text{FAD}} < 10 \text{ min}$ ) no existe una clara correlación entre la densidad de carga y el tiempo de inmersión. Incluso con el empleo de soluciones más diluidas (1 - 10  $\mu\text{M}$ ) para tiempos cortos ( $t_i^{\text{FAD}} < 2 \text{ min}$ ), la cantidad de carga calculada es  $q = 5 - 8 \mu\text{C cm}^{-2}$ . De estos resultados se puede concluir que la adsorción inicial del FAD al oro es rápida, con un cubrimiento al menos parcial de la superficie. Para tiempos de inmersión más largos ( $t_i^{\text{FAD}} > 10 \text{ min}$ ), el aumento en carga es progresivo con  $t_i^{\text{FAD}}$ , acercándose hacia una saturación para  $t_i^{\text{FAD}} = 60 \text{ min}$ . Para tiempos aún mayores ( $t_i^{\text{FAD}} = 18 - 48 \text{ hs}$ ) se alcanzan cargas de 20 - 25  $\mu\text{C cm}^{-2}$ , que corresponderían a agregados de moléculas, según se pudo constatar por imágenes de STM (**Fig. 4.7b**).



**Figura 4.7.** a) Gráfico de densidad de carga anódica en función del tiempo de inmersión de sustratos de Au(111) en solución acuosa de FAD 100  $\mu\text{M}$ . b) Imagen de STM de 200 nm x 200 nm de un sustrato de Au(111) después de 48 hs de inmersión, se pueden observar agregados de moléculas distribuidos uniformemente sobre la superficie ( $Z = 4 \text{ nm}$ ).

Para tiempos cortos de inmersión ( $t_i^{\text{FAD}} < 2 \text{ min}$ ) fue frecuente observar un hombro en el pico anódico a potenciales más positivos (**Figura 4.8a**). Las muestras preparadas en idénticas condiciones pero medidas en medio alcalino (NaOH 0,1 M), muestran la cupla

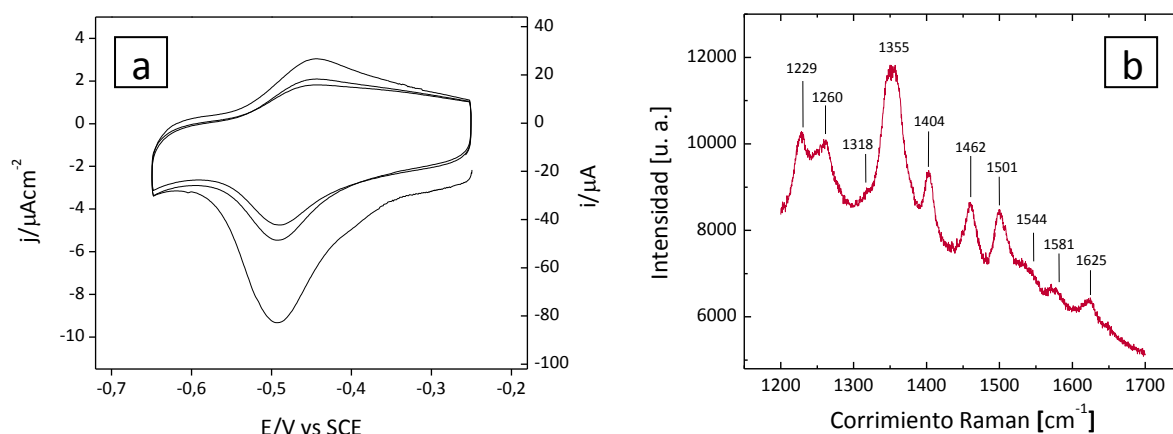
reversible a  $E_p^{1/2} = -0,70$  V y el mismo hombro (**Fig. 4.8b**). Sin embargo en este caso, con el ciclado sucesivo, se pierde paulatinamente el material adsorbido y el hombro se va acentuando hasta ser un pico con a  $E_p^{1/2} = -0,62$  V. Para tiempos de inmersión más largos ( $t_i^{FAD} \geq 15$  min) medidos en medio alcalino, se obtuvieron comportamientos disímiles, inclusive para un mismo tiempo de inmersión. Desde el primer ciclo se encontró una relación variable entre los dos picos; en la **Fig. 4.8c** se muestran los dos extremos de este comportamiento. Sin embargo, la densidad de carga resultante de la integración de ambos picos es similar para un mismo tiempo de inmersión.



**Figura 4.8.** Voltamperogramas cíclicos de FAD inmovilizado sobre un sustrato de Au(111). a)  $t_i^{FAD} = 1$  min en buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ Vs}^{-1}$  y  $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ . En NaOH 0,1 M a  $v = 0,2 \text{ Vs}^{-1}$ : b) 20 primeros ciclos para  $t_i^{FAD} = 1$  min y c) dos muestras distintas para  $t_i^{FAD} = 15$  min.

De estos resultados, se pueden resaltar dos puntos importantes. En primer lugar, debido al rápido cubrimiento de la superficie y a la permanencia durante los ciclados, el FAD tiene una gran afinidad por el sustrato de oro contrariamente a lo observado por otros autores.<sup>[13, 14]</sup> Esta diferencia podría radicar en el empleo de sustratos de distinta estructura superficial, cuestión que trataremos más adelante. Por otro lado, además de la influencia del pH del medio en el valor de  $E_p$ , ya que la reacción redox está acoplada a  $2H^+$  y varía en -0,04 V por unidad de pH,<sup>[26]</sup> el equilibrio de protonación del FAD también influencia en la interacción del FAD con el sustrato.

Sobre sustratos nanoestructurados, la inmovilización es menos eficiente que sobre los sustratos orientados (111) (**Figura 4.9a**). La cupla redox se ve menos definida y el material adsorbido se pierde más rápidamente por sucesivos ciclados. Sin embargo, la ventaja de este material radica en dos aspectos. Uno está relacionado con la mayor área superficial, ya que de este modo se consigue una mayor cantidad de FAD adsorbida, a pesar de la menor eficiencia, lo que se refleja en los ejes de corriente (**Fig. 4.6** y **Fig. 4.9a**). El otro aspecto está vinculado con la cualidad de amplificar las señales Raman del FAD, las cuales no tienen intensidad suficiente para ser medidas sobre los sustratos de Au(111).



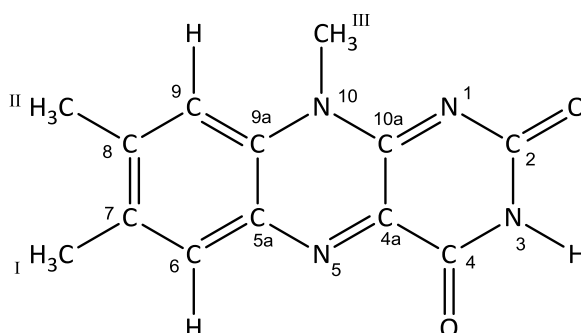
**Figura 4.9.** a) Voltamperograma cíclico de FAD inmovilizado sobre un sustrato de oro rugoso para  $t_i^{FAD} = 30$  min en buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 a  $v = 0,1 \text{ Vs}^{-1}$ . b) Espectro SERS de FAD sobre oro rugoso para  $t_i^{FAD} = 30$  min tomado con un laser de excitación de 647 nm, un tiempo de adquisición de 60 s y una potencia de 80mW.

En la **Fig. 4.9b** se muestra el espectro SERS ex situ de FAD inmovilizado sobre oro nanoestructurado, donde se pueden observar las vibraciones características de la forma oxidada. Las 10 bandas indicadas en el espectro coinciden con las reportadas entre 1200 y

1700  $\text{cm}^{-1}$  para espectros Raman resonante<sup>[42, 43]</sup> y SERS<sup>[44]</sup> de flavinas. El sistema electrónico extendido del grupo isoaloxazina posee fuertes transiciones  $\pi\text{-}\pi^*$ , las cuales proveen un aumento en los modos de vibración de las bandas halladas.<sup>[42, 43]</sup> Teniendo en cuenta datos de IR complementarios, Abe y Kyogoku<sup>[43]</sup> calcularon los modos de vibración en el plano para lumiflavina, la cual es la más sencilla de las moléculas perteneciente a la familia de las flavinas. En la **Tabla 4.1** se muestra una lista con las bandas observadas en el espectro SERS de FAD (**Fig. 4.b**) así como las frecuencias calculadas y asignaciones según Abe y Kyogoku.

**Tabla 4.1.** Asignación de las bandas del espectro SERS del FAD de acuerdo a los modos calculados para lumiflavina (debajo se muestra la estructura y numeración de la molécula).

FAD	Lumiflavina	
$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	$\nu$ calculada [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Asignación <sup>[43]</sup>
1229	1218	$\nu$ (C <sub>6</sub> -C <sub>7</sub> ), $\nu$ (C <sub>8</sub> -Me)
1260	1258	$\nu$ (C <sub>4</sub> -C <sub>4a</sub> ), $\nu$ (C <sub>4</sub> -N <sub>3</sub> )
1318	1316	$\nu$ (N <sub>5</sub> -C <sub>5a</sub> ), $\delta^{\text{S}}\text{CH}_3^{\text{II}}$
1355	1352	$\nu$ (C <sub>5a</sub> -C <sub>6</sub> ), $\nu$ (N <sub>10</sub> -C <sub>10a</sub> ), $\nu$ (C <sub>5a</sub> -C <sub>9a</sub> )
1404	1394	$\nu$ (C <sub>2</sub> -N <sub>1</sub> ), $\nu$ (C <sub>2</sub> -N <sub>3</sub> ), $\nu$ (C <sub>5a</sub> -C <sub>6</sub> ), $\nu$ (C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub> )
1462	1483	$\nu$ (C <sub>7</sub> -C <sub>8</sub> ), $\nu$ (C <sub>8</sub> -Me)
1501	1500	$\nu$ (C <sub>4a</sub> -N <sub>5</sub> ), $\nu$ (C <sub>9a</sub> -N <sub>10</sub> )
1544	1548	$\nu$ (N <sub>1</sub> -C <sub>10a</sub> ), $\nu$ (C <sub>4a</sub> -N <sub>5</sub> )
1581	1586	$\nu$ (N <sub>1</sub> -C <sub>10a</sub> ), $\nu$ (N <sub>10</sub> -C <sub>10a</sub> )
1625	1620	$\nu$ (C <sub>5a</sub> -C <sub>9a</sub> ), $\nu$ (C <sub>4a</sub> -N <sub>5</sub> )

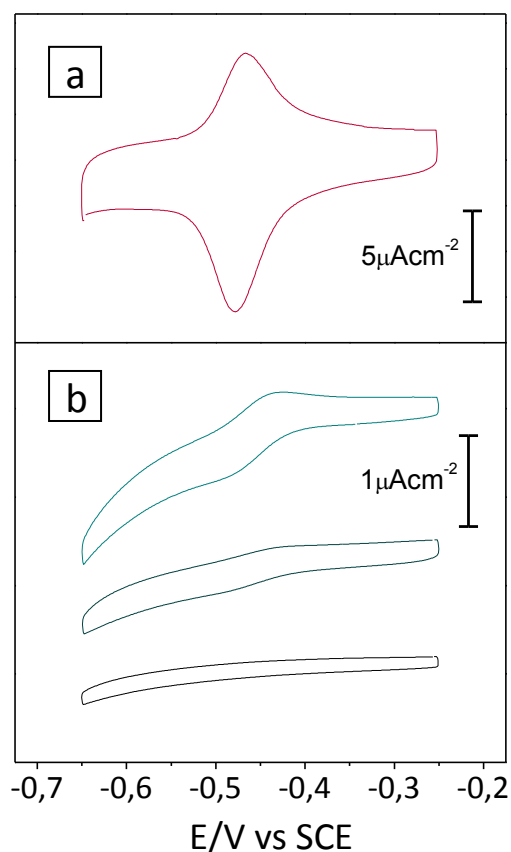


Cabe destacar que las diferencias halladas en la intensidad y posición de las bandas respecto a los trabajos mencionados, están relacionadas por un lado con la adsorción del FAD a la superficie nanoestructurada de oro, la cual puede amplificar preferencialmente algún modo más que otro. Por otro lado, la obtención de espectros Raman resonantes



implica el uso de lasers de excitación entre 200 nm y 488 nm, los cuales están sujetos a interferencia por la fluorescencia de las flavinas.<sup>[42, 43]</sup> Por esta razón, se utilizó un laser de 647 nm, de modo de evitar la fluorescencia, ofreciendo una distinta excitación para el FAD.

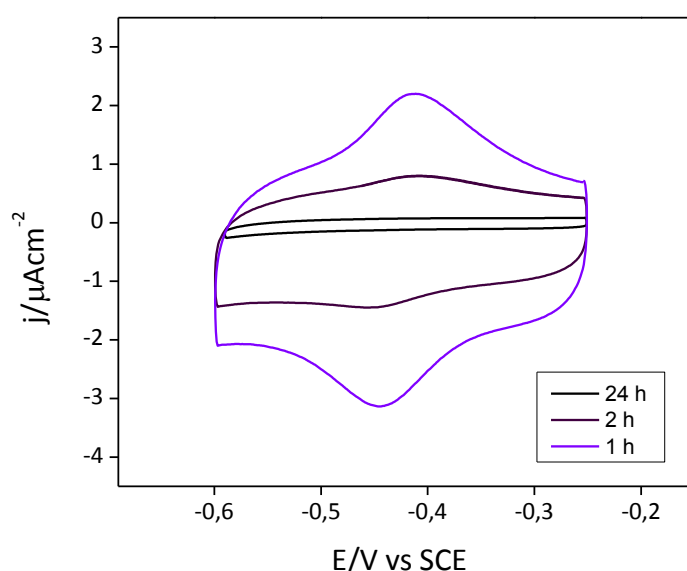
En un entorno proteico, el FAD se encuentra inmovilizado por interacciones débiles y aislado de su entorno. Las SAMs de alcanotioles son un modelo sencillo para estudiar estas interacciones a través de la transferencia de carga desde la molécula hacia la interfaz del electrodo de trabajo. La **Figura 4.10b** muestra la respuesta del FAD en buffer fosfato 0,1 M pH = 7,4 inmovilizado sobre SAMs de distinto largo de cadena. Las SAMs se formaron con tiempos largos de inmersión (~ 24 hs), por lo tanto, la cantidad de defectos que poseen es muy baja, lo que se refleja en la baja capacidad de la doble capa ( $3,7 \mu\text{F cm}^{-2}$  para PT,  $2,6 \mu\text{F cm}^{-2}$  para HT y  $1,3 \mu\text{F cm}^{-2}$  para NT).



**Figura 4.10.** Voltamperogramas cíclicos de FAD inmovilizado sobre Au(111) para  $t_i^{\text{FAD}} = 30 \text{ min}$  en buffer fosfato 0,1 M pH = 7,4 a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ , a) sin modificar y b) sobre SAMs de PT, HT y NT (de arriba abajo).

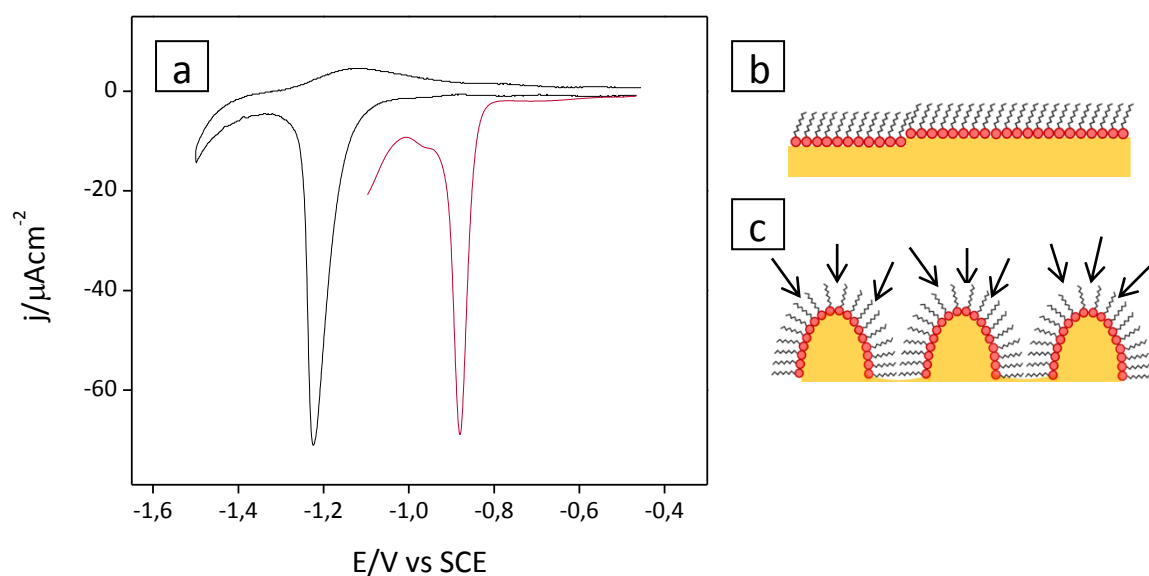
De aquí podría concluirse que la transferencia de carga del FAD disminuye paulatinamente a medida que aumenta el largo de la cadena hidrocarbonada, siendo prácticamente nula para  $n \geq 9$ . Sin embargo, Takehara *et al.*<sup>[45]</sup> reportan que el FAD es capaz de transferir carga desde solución a través de SAMs de  $n = 5 - 18$  formadas por inmersión de electrodos de oro policristalino en soluciones etanólicas de alcanotioles 20 mM con  $t_i = 15$  min. Para comprender esta discrepancia, se estudió en primer lugar la relación entre los defectos de la SAM y la inmovilización de FAD en sustratos de Au(111).

La **Figura 4.11** muestra SAMs de DDT preparadas con distintos tiempos de inmersión ( $t_i = 1, 2$  y  $24$  h) del sustrato de oro en solución de DDT  $50 \mu\text{M}$  en etanol. Si bien después de  $1$  h de inmersión la superficie se encuentra completamente cubierta de moléculas de DDT,<sup>[46]</sup> las cadenas hidrocarbonadas aún no forman el arreglo compacto que se encuentra a las  $24$  hs. El tiempo de inmersión de los sustratos modificados con SAMs de DDT en solución acuosa de FAD  $100 \mu\text{M}$  se extendió a  $t_i^{\text{FAD}} = 18$  h para asegurar una completa saturación de la superficie. Aun así, sobre SAMs formadas por  $24$  hs de inmersión no fue posible detectar la cupla redox del FAD. A tiempos menores de formación de SAM ( $t_i < 2$  h), la cupla pudo detectarse con cierta dispersión en los datos, ya que la presencia de defectos debido al desorden de las cadenas no responde a un proceso controlado.



**Figura 4.11.** Voltamperogramas cíclicos de FAD inmovilizado sobre Au(111) para  $t_i^{\text{FAD}} = 18$  hs en buffer fosfato  $0,1 \text{ M}$   $\text{pH} = 7,0$  a  $v = 0,1 \text{ Vs}^{-1}$ , sobre SAMs de DDT preparadas con tiempos de inmersión  $t_i = 1$  h,  $2$  h y  $24$  h.

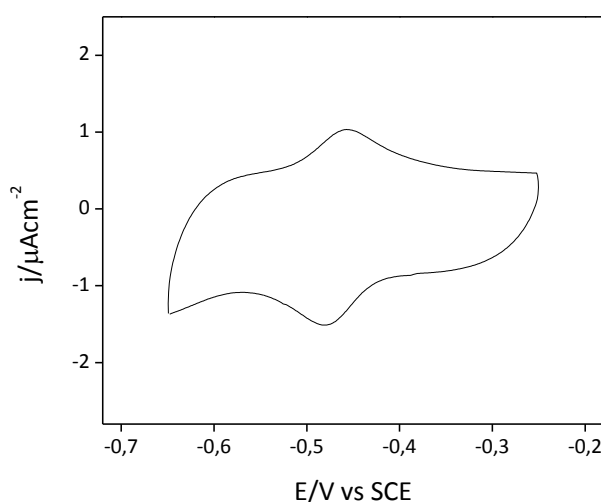
Además de la influencia de los defectos de las SAMs en la inmovilización del FAD, estudiaremos también el efecto de la topografía del sustrato de oro para poder explicar la discrepancia sobre la transferencia de carga del FAD a través de la SAM. Resulta sencillo pensar en una SAM ordenada en sustratos monocristalinos, sin embargo la imagen cambia cuando el sustrato está compuesto por granos como ocurre con los policristales. Las superficies de oro nanoestructurado representarían un caso aún más extremo para ilustrar la influencia del sustrato. Si se estudia la electrodesorción de una SAM de BT autoensamblada en oro nanoestructurado (**Figura 4.12a**), se obtiene un pico a -1,22 V que involucra una carga de  $85,5 \mu\text{C cm}^{-2}$ . Esta carga está dentro de lo esperado para un cubrimiento máximo de alcanotioles (para  $\theta = 0,33$  corresponde idealmente a  $\sim 74 \mu\text{C cm}^{-2}$ ). Sin embargo, se puede notar un gran corrimiento del potencial de electrodesorción respecto al BT sobre superficies de Au(111) en las mismas condiciones experimentales (**Fig. 4.12a**), lo que implica una mayor estabilidad de la SAM.<sup>[47]</sup>



**Figura 4.12.** a) Voltamperogramas cíclicos de SAMs de BT sobre Au(111) (rojo) y sobre oro nanoestructurado (negro) en solución de NaOH 0,1 M a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . Esquemas de superficies b) lisa y c) nanoestructurada cubiertas por una SAM.

Contrario al resultado obtenido para superficies de Au(111) (**Fig. 4.11**, línea negra), es posible observar la transferencia de carga de FAD a través de una SAM de DDT formada con  $t_i = 24 \text{ h}$  (**Figura 4.13**). A pesar de un denso cubrimiento de la superficie, la geometría

superficial (**Fig. 4.12c**) genera un desorden en las cadenas, permitiendo la detección del FAD. De hecho, a través de medidas de PM-IRRAS se puede seguir la frecuencia de vibración antisimétrica de los metilenos, la cual corresponde a  $2917\text{ cm}^{-1}$  para octadecanotiol (ODT) en estado cristalino y a  $2927\text{ cm}^{-1}$  para hexanotiol (HT) en estado líquido.<sup>[48]</sup> Entonces, mientras que las medidas de SAMs de DDT sobre Au(111) arrojan valores alrededor de  $2919\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a un arreglo ordenado de las cadenas, las SAMs sobre sustratos rugosos presentan valores de  $2927\text{ cm}^{-1}$ , con un desorden de las cadenas similar al hallado en tioles en estado líquido.<sup>[49]</sup>



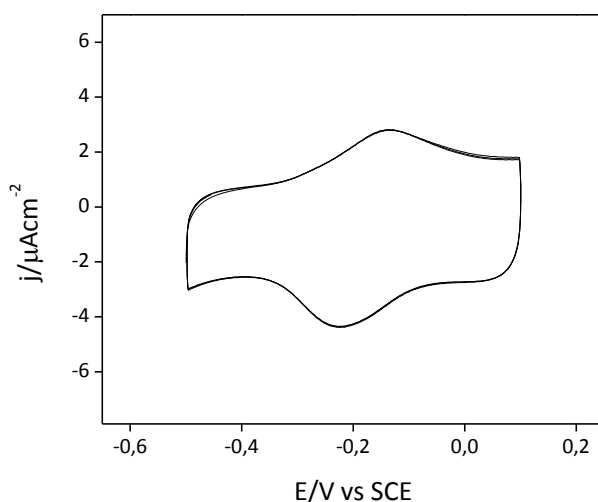
**Figura 4.13.** Voltamperograma cíclico de FAD inmovilizado ( $t_i^{\text{FAD}} = 30\text{ min}$ ) sobre una SAM de DDT ( $t_i = 24\text{ h}$ ) en oro nanoestructurado medido en buffer fosfato  $0,1\text{ M}$   $\text{pH} = 7,4$  a  $v = 0,05\text{ Vs}^{-1}$ .

Con esta última evidencia, es posible reconciliar los resultados obtenidos con los de Takehara *et al.* El método de preparación de la SAM y el tipo de sustrato influyen en las propiedades de la SAM tales como su capacidad de barrera. Resulta entonces de suma importancia la caracterización de la biomolécula en distintos sistemas modelo como paso previo al estudio en sistemas de mayor complejidad.

#### 4.4 Azul de metileno

Si bien el azul de metileno (MB) es una molécula sintética, su relevancia en sistemas biológicos es tal que es frecuente encontrarla listada en tablas de potencial redox de moléculas biológicas. Su inmovilización sobre SAMs de alcanotioles simples y funcionalizados con grupos carboxilato terminales ha sido extensamente estudiada mediante distintas técnicas.<sup>[50-52]</sup> Aquí se mostrarán algunos resultados para la inmovilización del MB siguiendo los mismos procedimientos utilizados para el FAD, con el fin de comparar el comportamiento de ambas moléculas.

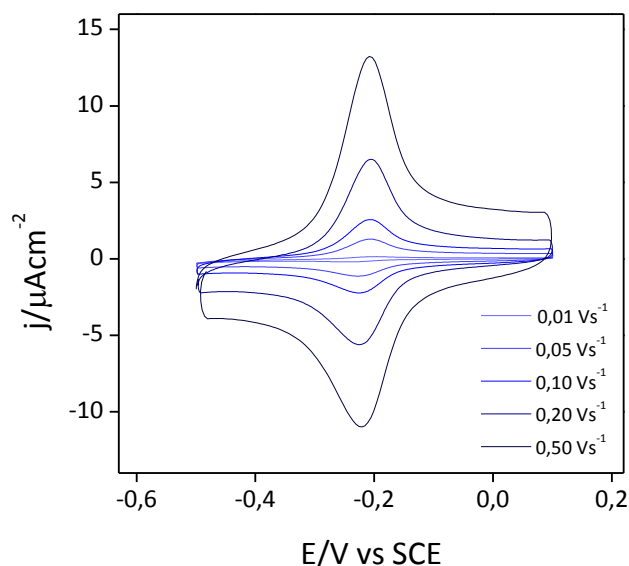
La **Figura 4.14** muestra el voltamperograma de un sustrato de Au(111) después de 30 min de inmersión en una solución acuosa de MB 100  $\mu\text{M}$ . A diferencia del FAD (**Fig. 4.6**), la adsorción sobre el oro es pobre, registrándose tan solo 3  $\mu\text{C cm}^{-2}$ . De acuerdo a Vericat *et al.*,<sup>[52]</sup> una monocapa de moléculas de MB densamente empaquetada transfiere una  $q = 50 \mu\text{C cm}^{-2}$ , por lo tanto, en este caso sólo una fracción de moléculas permanece unida a la superficie.



**Figura 4.14.** Voltamperograma cíclico de MB inmovilizado sobre un sustrato de Au(111) realizado en buffer fosfato 0,1 M pH = 7,0 a una  $v = 0,1 \text{ Vs}^{-1}$ .

Otro comportamiento distinto al observado para el FAD, fue la inmovilización sobre SAMs de DDT formadas por inmersión de 24 hs. Mientras que no era posible detectar la cupla del FAD (**Fig. 4.11**, línea negra), el MB muestra una cupla reversible con  $E_p^{1/2} = -0,215 \text{ V}$  (**Figura 4.15**). Las cargas de reducción y oxidación fueron de 2,1 y 2,8  $\mu\text{C cm}^{-2}$

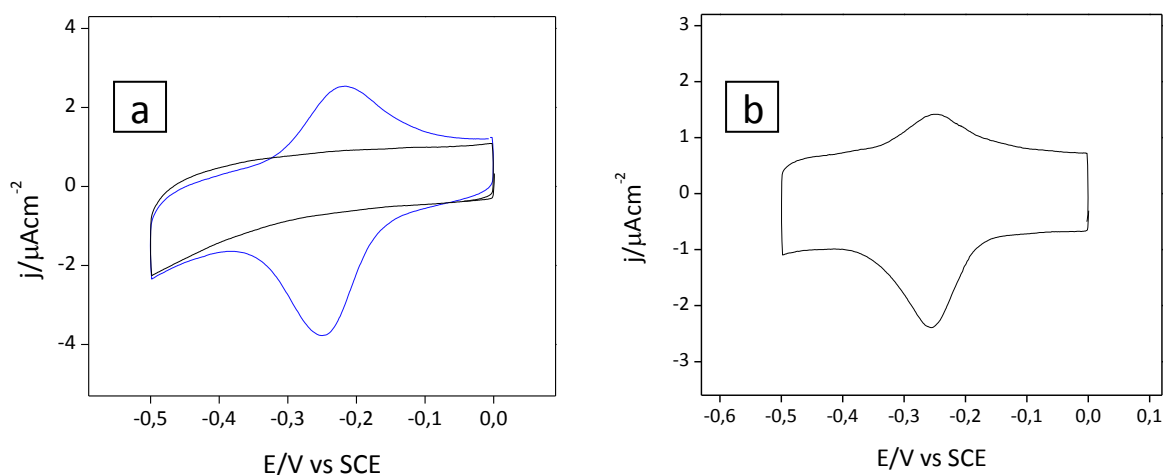
respectivamente. Las moléculas permanecen fuertemente inmovilizadas ya que la pérdida por ciclados sucesivos es lenta.



**Figura 4.15.** Voltamperograma cíclico de MB inmovilizado sobre una SAM de DDT sobre un sustrato de Au(111) realizado en buffer fosfato 0,1 M pH = 7,0 a  $v = 0,01; 0,05; 0,1; 0,2$  y  $0,5 \text{ Vs}^{-1}$ .

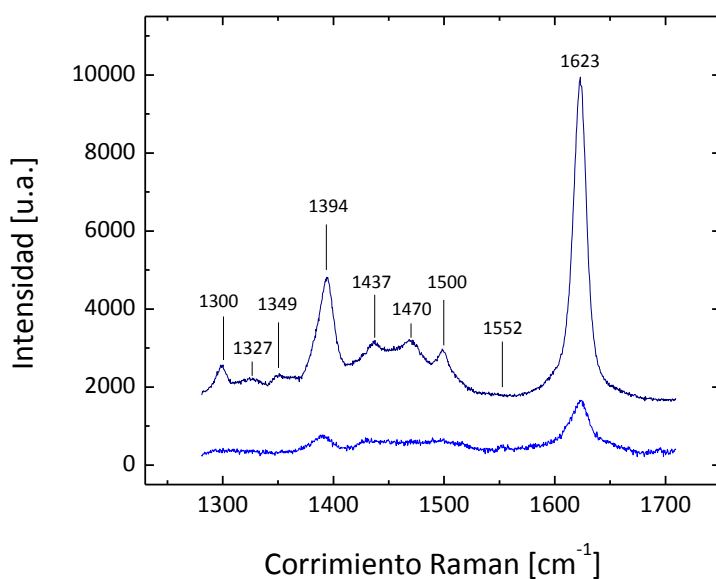
Por último, estudiaremos la interacción del MB sobre una SAM hidrofílica sin carga neta. La **Figura 4.16** muestra la cupla de MB inmovilizada sobre SAMs de DTT sobre Au(111) (**Fig. 4.16a**) y sobre oro nanoestructurado (**Fig. 4.16b**) tras 30 min de inmersión en solución acuosa de MB. La SAM de DTT exhibe una capacidad de doble capa de  $\sim 14 \mu\text{F cm}^{-2}$ , un valor bastante alto comparado con las SAMs de alcanotioles simples, no obstante, es el frecuentemente encontrado para estas SAMs densamente empaquetadas. En este caso, las cargas de reducción y oxidación fueron de  $5,7$  y  $4,2 \mu\text{C cm}^{-2}$  respectivamente. Si bien los valores son mayores respecto a los obtenidos para la inmovilización sobre DDT, la pérdida en los ciclos sucesivos es mayor, por lo que la molécula no permanece fuertemente retenida.

Si analizamos la naturaleza de cada SAM, podríamos decir que sobre el DTT las moléculas de MB se adsorben externamente mientras que sobre DDT, el MB se intercalaría entre las cadenas, probablemente a través de defectos, para poder transferir carga. A través de la adsorción externa tiene mayor contacto con el solvente libre de MB, donde se pierde por lavado, en tanto que entre las cadenas hidrocarbonadas se encuentra unido mediante interacciones hidrofóbicas y protegido del entorno.



**Figura 4.16.** a) Voltamperogramas cíclicos de un sustrato de Au(111) modificado con una SAM de DTT con MB inmovilizado (azul) y sin MB (negro), medidos en buffer fosfato 0,1M pH = 7,4 a  $v = 0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . b) Voltamperograma cíclico de un sustrato de oro nanoestructurado modificado con una SAM de DTT con MB inmovilizado, medido en buffer fosfato 0,1 M pH = 7,4 a  $v = 0,1 \text{ Vs}^{-1}$ .

Usaremos los resultados sobre DTT para contrastar las señales Raman del MB obtenidas sobre sustratos de Au(111) y nanoestructurados. La **Figura 4.17** muestra los espectros SERS donde se pueden observar las vibraciones características del MB oxidado en ambos sustratos. A diferencia del FAD, el MB tiene una intensidad suficiente para ser detectado sobre el sustrato liso. Sin embargo, las señales sobre el sustrato nanoestructurado son más definidas e intensas respecto del sustrato de Au(111).



**Figura 4.17.** Espectros SERS de MB sobre una SAM de DTT en Au(111) (inferior) y oro nanoestructurado (superior) tomados con un laser de excitación de 568 nm, un tiempo de adquisición de 120 s y una potencia de 10 mW.

Las bandas observadas para el espectro de MB en la región de  $1280 - 1710 \text{ cm}^{-1}$  coinciden con las reportadas anteriormente.<sup>[51, 53, 54]</sup> Como se comentó en el caso del FAD, la intensidad de las bandas así como la exaltación preferencial de algunos modos de vibración depende tanto del sustrato SERS como del laser de excitación empleado.

La asignación, según la literatura,<sup>[54-58]</sup> de los modos de vibración característicos para cada banda se resume en la **Tabla 4.2**. Las asignaciones se dificultan debido al acoplamiento entre modos vibracionales, por lo tanto, se recurre al estudio de moléculas relacionadas más sencillas como tioninas, fenotiazinas, fenazinas, quinolinas y otros compuestos azufrados y nitrogenados.<sup>[54, 56, 59]</sup>

**Tabla 4.1.** Asignación de las bandas del espectro SERS del MB.

$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Asignación <sup>[54-58]</sup>
1300	$\nu_{\text{sim}}$ (C-N) centro, $\alpha$ (C-H) anillo, $\nu$ (C-C) anillo
1327	
1349	
1394	$\nu_{\text{sim}}$ (C-N) centro y lateral, $\nu$ (C-C) anillo, $\alpha$ (C-H) anillo, $\delta$ ( $\text{CH}_3$ )
1437	$\nu_{\text{sim}}$ (C-N), $\nu$ (C-C) anillo, $\delta$ ( $\text{CH}_3$ )
1470	$\nu_{\text{asim}}$ (C-N) centro, $\alpha$ (C-H) anillo, $\delta$ ( $\text{CH}_3$ ), $\nu$ (C-C) anillo
1500	$\nu_{\text{sim}}$ (C-N) lateral, $\alpha$ (C-H) anillo, $\delta$ ( $\text{CH}_3$ ), $\nu$ (C-C) anillo
1552	$\nu_{\text{asim}}$ (C-C)
1623	$\nu$ (C-N-C) anillo, $\nu$ (C-C) anillo, $\alpha$ (C-H) anillo

Debido a la intensidad de la banda a  $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ , generalmente se la emplea como trazador para comparar la cantidad de MB inmovilizado sobre distintas superficies o bien según cada protocolo de preparación, así como para analizar el factor de amplificación aparente (AEF) para SERS.<sup>[54]</sup>

## 4.5 Conclusiones

Es posible adsorber eficientemente FAD sobre sustratos de Au(111). Las SAMs de alcanotioles sobre oro ofrecen una barrera para la transferencia de carga de la molécula, siendo prácticamente nula a partir de  $n > 6$ . Este comportamiento cambia sobre sustratos



nanoestructurados, donde es posible detectar la molécula a través de las SAMs ya que las cadenas no se encuentran ordenadas.

El MB se adsorbe pobremente sobre el oro sin modificar. A diferencia del FAD, el MB transfiere carga a través de las SAMs de DDT sobre Au(111). La adsorción inicial es mayor sobre SAMs hidrofílicas, sin embargo permanece más fuertemente retenido en las SAMs hidrofóbicas de DDT.

MB y FAD muestran espectros de SERS con bandas bien definidas sobre sustratos nanoestructurados, únicamente el MB puede ser detectado sobre sustratos de Au(111).

## 4.6 Referencias

1. Niemz, A.; Rotello, V. M. (1999) From Enzyme to Molecular Device. Exploring the Interdependence of Redox and Molecular Recognition, *Acc. Chem. Res.* 32, 44-52.
2. Scheller, F. W.; Wollenberger, U.; Lei, C.; Jin, W.; Ge, B.; Lehmann, C.; Lisdat, F.; Fridman, V. (2002) Bioelectrocatalysis by redox enzymes at modified electrodes, *Rev. Mol. Biotechnol.* 82, 411-424.
3. Song, S.; Clark, R. A.; Bowden, E. F.; Tarlov, M. J. (1993) Characterization of cytochrome c/alkanethiolate structures prepared by self-assembly on gold, *J. Phys. Chem.* 97, 6564-6572.
4. Cooke, G.; Duclairoir, F. M. A.; John, P.; Polwart, N.; Rotello, V. M. (2003) Model systems for flavoenzyme activity: flavin-functionalised SAMs as models for probing redox modulation through hydrogen bonding, *Chem. Commun.*, 2468-2468.
5. Tam-Chang, S.-W.; Mason, J.; Iverson, I.; Hwang, K.-O.; Leonard, C. (1999) Modulating the pH-dependent redox potential of a flavin analog via incorporation into a self-assembled monolayer on gold, *Chem. Commun.*, 65-66.
6. Voet, D.; Voet, J. G. (2004) *Biochemistry*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
7. Bacher, A.; Eberhardt, S.; Fischer, M.; Kis, K.; Richter, G. (2000) Biosynthesis of vitamin B2 (Riboflavin), *Annu. Rev. Nutr.* 20, 153-167.
8. Lambert, E.; Breinlinger, E. C.; Rotello, V. M. (1995) Selective transport of riboflavin through a liquid organic membrane, *J. Org. Chem.* 60, 2646-2647.
9. Bafunno, V.; Giancaspero, T. A.; Brizio, C.; Bufano, D.; Passarella, S.; Boles, E.; Barile, M. (2003) Riboflavin Uptake and FAD Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria: Involvement of the Flx1p carrier in FAD export, *J. Biol. Chem.* 279, 95-102.
10. Massey, V. (2000) The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin, *Biochem. Soc. Trans.* 28, 283-296.
11. Massey, V.; Palmer, G. (1966) On the Existence of Spectrally Distinct Classes of Flavoprotein Semiquinones. A New Method for the Quantitative Production of Flavoprotein Semiquinones, *Biochemistry* 5, 3181-3189.
12. Clark, W. M. (1938) Potential Energies of Biologically Important Oxidation-Reduction Systems, *J. Appl. Phys.* 9, 97-97.
13. Gorton, L.; Johansson, G. (1980) Cyclic voltammetry of FAD adsorbed on graphite, glassy carbon, platinum and gold electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 113, 151-158.
14. Wang, Y.; Zhu, G.; Wang, E. (1997) Electrochemical behavior of FAD at a gold electrode studied by electrochemical quartz crystal microbalance, *Anal. Chim. Acta* 338, 97-101.

15. Birss, V. I.; Elzanowska, H.; Turner, R. A. (1988) The electrochemical behavior of flavin adenine dinucleotide in neutral solutions, *Can. J. Chem.* **66**, 86-96.
16. Kakutani, T.; Katasho, I.; Senda, M. (1983) Electrochemical Oxidation and Reduction of Flavin-Adenine Dinucleotide Adsorbed on a Mercury Electrode Surface *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **56**, 1761-1767.
17. Birss, V. I.; Guha-Thakurta, S.; McGarvey, C. E.; Quach, S.; Vanýsek, P. (1997) An electrochemical study of the photolysis of adsorbed flavins, *J. Electroanal. Chem.* **423**, 13-21.
18. Garjonyte, R.; Malinauskas, A.; Gorton, L. (2003) Investigation of electrochemical properties of FMN and FAD adsorbed on titanium electrode, *Bioelectrochemistry* **61**, 39-49.
19. Zhang, J.; Chi, Q.; Wang, E.; Dong, S. (1995) A comparative study on stm imaging and electrocatalytic activity of different surfaces modified with flavin adenine dinucleotide, *Electrochim. Acta* **40**, 733-744.
20. Wei, H. Z.; van de Ven, T. G. M.; Omanovic, S.; Zeng, Y. W. (2008) Adsorption Behavior of Dinucleotides on Bare and Ru-Modified Glassy Carbon Electrode Surfaces, *Langmuir* **24**, 12375-12384.
21. Lin, K.-C.; Chen, S.-M. (2005) The electrochemical self-assembly of the FAD modified zinc oxide films and their electrocatalytic properties, *J. Electroanal. Chem.* **578**, 213-222.
22. Yamashita, M.; Rosatto, S. S.; Kubota, L. T. (2002) Electrochemical Comparative Study of Riboflavin, FMN and FAD Immobilized on the Silica Gel Modified with Zirconium Oxide, *J. Braz. Chem. Soc.* **13**, 635-641.
23. Smith, E. T.; Davis, C. A.; Barber, M. J. (2003) Voltammetric simulations of multiple electron transfer/proton transfer coupled reactions: flavin adenine dinucleotide as a model system, *Anal. Biochem.* **323**, 114-121.
24. Willner, I.; Heleg-Shabtai, V.; Blonder, R.; Katz, E.; Tao, G.; Bückmann, A. F.; Heller, A. (1996) Electrical Wiring of Glucose Oxidase by Reconstitution of FAD-Modified Monolayers Assembled onto Au-Electrodes, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10321-10322.
25. Liu; Paddon-Row, M. N.; Gooding, J. J. (2004) Heterogeneous Electron-Transfer Kinetics for Flavin Adenine Dinucleotide and Ferrocene through Alkanethiol Mixed Monolayers on Gold Electrodes, *J. Phys. Chem. B* **108**, 8460-8466.
26. Calvo, E. J.; Rothacher, M. S.; Bonazzola, C.; Wheeldon, I. R.; Salvarezza, R. C.; Vela, M. E.; Benitez, G. (2005) Biomimetics with a Self-Assembled Monolayer of Catalytically Active Tethered Isoalloxazine on Au, *Langmuir* **21**, 7907-7911.
27. Wilson, R.; Turner, A. P. F. (1992) Glucose oxidase: an ideal enzyme, *Biosensors Bioelectron.* **7**, 165-185.
28. Blevins, S. M.; Bronze, M. S. (2010) Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology, *Int. J. Infect. Dis.* **14**, e744-e751.
29. Guttman, P.; Ehrlich, P. (1891) Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria, *Berlin Klin. Wochenschr.* **28**, 953-956.
30. Sharman, W. M.; Allen, C. M.; van Lier, J. E. (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, *Drug Discov. Today* **4**, 507-517.
31. Tardivo, J.; Delgiglio, A.; Deoliveira, C.; Gabrielli, D.; Junqueira, H.; Tada, D.; Severino, D.; Defatimaturchiello, R.; Baptista, M. (2005) Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications, *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2**, 175-191.
32. Fierz-David, H. E.; Blangey, L. (1949) *Fundamental Processes of Dye Chemistry*, 7th ed., Interscience Publishers, Inc., New York, pág. 311.
33. Buchholz, K.; Schirmer, R. H.; Eubel, J. K.; Akoachere, M. B.; Dandekar, T.; Becker, K.; Gromer, S. (2008) Interactions of Methylene Blue with Human Disulfide Reductases and Their Orthologues from Plasmodium falciparum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 183-191.
34. Sagara, T.; Kawamura, H.; Nakashima, N. (1996) Electrode Reaction of Methylene Blue at an Alkanethiol-Modified Gold Electrode As Characterized by Electoreflectance Spectroscopy, *Langmuir* **12**, 4253-4259.

35. May, J. M.; Qu, Z.-c.; Cobb, C. E. (2004) Reduction and uptake of methylene blue by human erythrocytes, *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C1390-1398-C1390-1398.
36. Gabrielli, D.; Belisle, E.; Severino, D.; Kowaltowski, A. J.; Baptista, M. S. (2007) Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions, *Photochem. Photobiol.* 79, 227-232.
37. Caetano, W.; Haddad, P. S.; Itri, R.; Severino, D.; Vieira, V. C.; Baptista, M. S.; Schröder, A. P.; Marques, C. M. (2007) Photo-Induced Destruction of Giant Vesicles in Methylene Blue Solutions, *Langmuir* 23, 1307-1314.
38. Salvarezza, R. C.; Arvia, A. J. (1996) A Modern Approach to Surface Roughness Applied to Electrochemical Systems, in *Modern Aspects of Electrochemistry* (Conway, B. E., Bockris, J. O. M., and White, R. E., Eds.), pp 289-373, Plenum Press, New York.
39. Angerstein-Kozłowska, H.; Conway, B. E.; Hamelin, A.; Stoicoviciu, L. (1987) Elementary steps of electrochemical oxidation of single-crystal planes of Au Part II. A chemical and structural basis of oxidation of the (111) plane, *J. Electroanal. Chem.* 228, 429-453.
40. Hamelin, A. (1996) Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 1. Behaviour at low-index faces, *J. Electroanal. Chem.* 407, 1-11.
41. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. (2001) *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
42. Bowman, W. D.; Spiro, T. G. (1981) Normal mode analysis of lumiflavin and interpretation of resonance Raman spectra of flavoproteins, *Biochemistry* 20, 3313-3318.
43. Copeland, R. A.; Spiro, T. G. (1986) Ultraviolet resonance Raman spectroscopy of flavin mononucleotide and flavin-adenine dinucleotide, *J. Phys. Chem.* 90, 6648-6654.
44. Xu, J.; Birke, R. L.; Lombardi, J. R. (1987) Surface-Enhanced Raman Spectroscopy from Flavins Adsorbed on a Silver Electrode: Observation of the Unstable Semiquinone Intermediate, *J. Am. Chem. Soc.* 109, 5645-5649.
45. Takehara, K.; Takemura, H.; Ide, Y. (1993) Electrochemical Studies of the Permeation of FAD and UQ<sub>0</sub> into the Self-Assembled n-Alkanethiol Monolayer Formed on a Gold Electrode, *J. Colloid Interface Sci.* 156, 274-278.
46. Torrelles, X.; Vericat, C.; Vela, M. E.; Fonticelli, M. H.; Daza Millone, M. A.; Felici, R.; Lee, T.-L.; Zegenhagen, J.; Muñoz, G.; Martín-Gago, J. A.; Salvarezza, R. C. (2006) Two-Site Adsorption Model for the ( $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ )-R30° Dodecanethiolate Lattice on Au(111) Surfaces, *J. Phys. Chem. B* 110, 5586-5594.
47. Vericat, C.; Benítez, G. A.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C.; Tognalli, N. G.; Fainstein, A. (2007) Restricted Surface Mobility of Thiolate-Covered Metal Surfaces: A Simple Strategy to Produce High-Area Functionalized Surfaces, *Langmuir* 23, 1152-1159.
48. Grumelli, D.; Méndez De Leo, L. P.; Bonazzola, C.; Zamylny, V.; Calvo, E. J.; Salvarezza, R. C. (2010) Methylene Blue Incorporation into Alkanethiol SAMs on Au(111): Effect of Hydrocarbon Chain Ordering, *Langmuir* 26, 8226-8232.
49. Grumelli. resultados sin publicar.
50. Benítez, G.; Vericat, C.; Tanco, S.; Remes Lenicov, F.; Castez, M. F.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. (2004) Role of Surface Heterogeneity and Molecular Interactions in the Charge-Transfer Process through Self-Assembled Thiolate Monolayers on Au(111), *Langmuir* 20, 5030-5037.
51. Tognalli, N. G.; Fainstein, A.; Vericat, C.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. (2006) Exploring Three-Dimensional Nanosystems with Raman Spectroscopy: Methylene Blue Adsorbed on Thiol and Sulfur Monolayers on Gold, *J. Phys. Chem. B* 110, 354-360.
52. Vericat, C.; Lenicov, F. R.; Tanco, S.; Andreasen, G.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. (2002) Building Complex Two-Dimensional Structures: Methylene Blue on Self-Assembled Monolayer-Covered Au(111), *J. Phys. Chem. B* 106, 9114-9121.
53. Nicolai, S. H. A.; Rubim, J. C. (2003) Surface-Enhanced Resonance Raman (SERR) Spectra of Methylene Blue Adsorbed on a Silver Electrode, *Langmuir* 19, 4291-4294.

54. Sarkar, S.; Pande, S.; Jana, S.; Sinha, A. K.; Pradhan, M.; Basu, M.; Chowdhury, J.; Pal, T. (2008) Exploration of Electrostatic Field Force in Surface-Enhanced Raman Scattering: An Experimental Investigation Aided by Density Functional Calculations, *J. Phys. Chem. C* 112, 17862-17876.
55. Naujok, R. R.; Duevel, R. V.; Corn, R. M. (1993) Fluorescence and Fourier Transform Surface-Enhanced Raman Scattering Measurements of Methylene Blue Adsorbed onto a Sulfur-Modified Gold Electrode, *Langmuir* 9, 1771-1774.
56. Nicolai, S. H. d. A.; Rodrigues, P. R. P.; Agostinho, S. M. L.; Rubim, J. C. (2002) Electrochemical and spectroelectrochemical (SERS) studies of the reduction of methylene blue on a silver electrode, *J. Electroanal. Chem.* 527, 103-111.
57. Xiao, G.-N.; Man, S.-Q. (2007) Surface-enhanced Raman scattering of methylene blue adsorbed on cap-shaped silver nanoparticles, *Chem. Phys. Lett.* 447 305-309.
58. Aoki, P. H. B.; Volpati, D.; Caetano, W.; Constantino, C. J. L. (2010) Study of the interaction between cardiolipin bilayers and methylene blue in polymer-based Layer-by-Layer and Langmuir films applied as membrane mimetic systems, *Vib. Spectrosc* 54, 93-102.
59. Hutchinson, K.; Hester, R. E.; Albery, W. J.; Hillman, A. R. (1984) Raman spectroscopic studies of a thionine-modified electrode, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* 80, 2053-2053.

# Capítulo 5

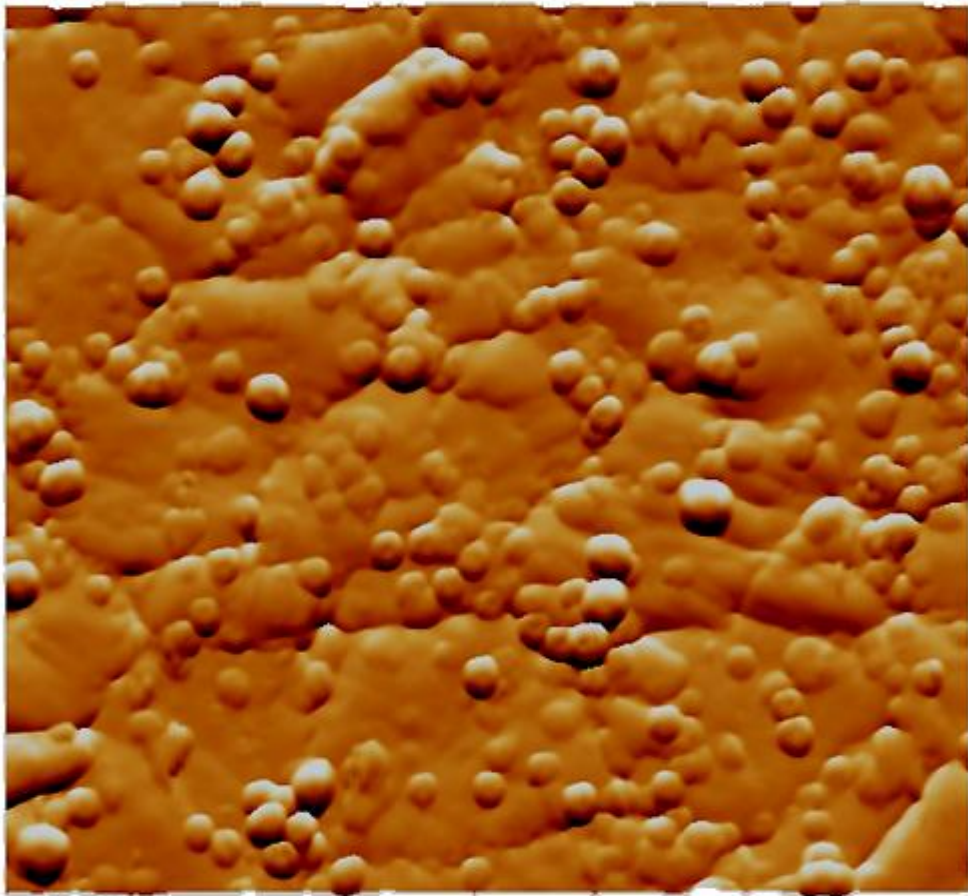
## Bicapas de fosfolípidos soportadas sobre monocapas autoensambladas de ditiotreitól

Las bicapas de DMPC se forman por fusión de vesículas sobre SAMs de DTT.

El MB y FAD se emplean como sondas externas para verificar la calidad de las mismas y ZnPc como sonda interna.

*"Hay que unirse, no para estar juntos, sino para hacer algo juntos."*

Juan Donoso Cortés

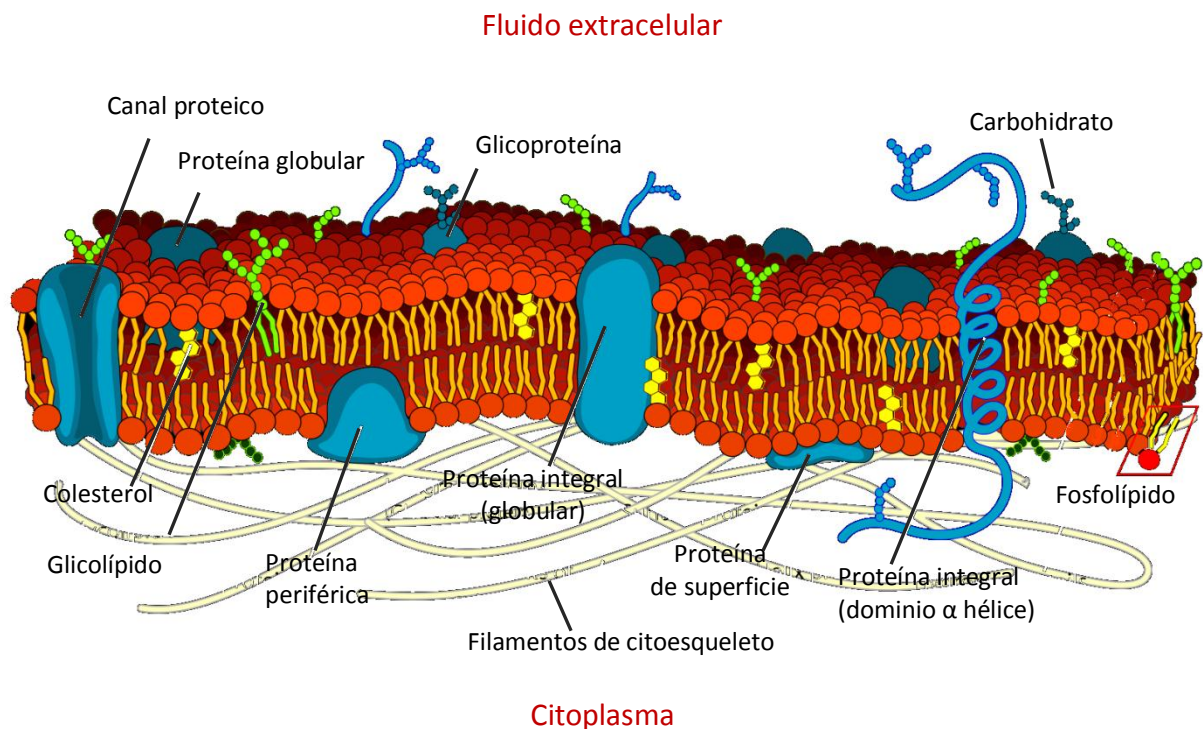


*"Come together"*

The Beatles (1969)

## 5.1 Introducción

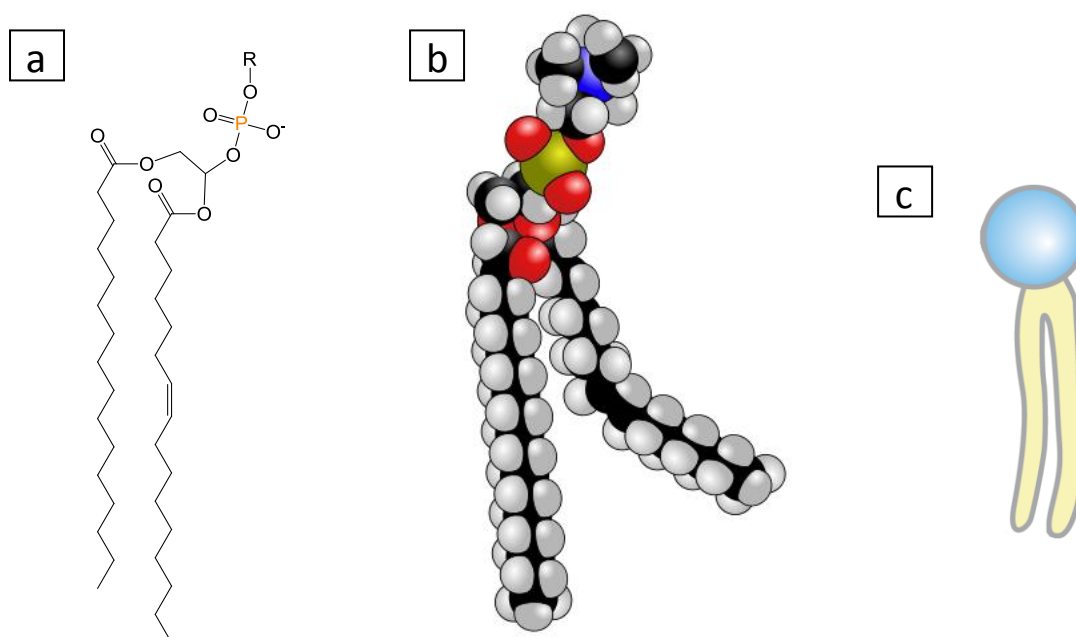
La base estructural de las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la cual puede ser definida como una organización supramolecular consistente en un arreglo bidimensional constituido por moléculas de fosfolípidos.<sup>[1, 2]</sup> Este conjunto de moléculas maximiza su estabilidad y se mantiene unido por los extremos de las cadenas hidrocarbonadas merced a las interacciones de van der Waals,<sup>[3]</sup> formando de esta manera una bicapa. Según el modelo de mosaico fluido,<sup>[1]</sup> aplicable a células eucariotas, la bicapa es una estructura bidimensional fluida en la que están insertadas y superficialmente asociadas diversas proteínas y péptidos que ejercen una gran diversidad de funciones (**Figura 5.1**).



**Figura 5.1.** Esquema de una bicapa lipídica, donde se pueden apreciar distintos componentes como proteínas, glúcidos y lípidos.

Dado que la bicapa lipídica constituye una barrera de permeabilidad para iones y moléculas polares, su estabilidad es decisiva para el mantenimiento de la compartimentalización celular. La cohesión de la estructura y el establecimiento de un orden bidimensional de largo alcance, es consecuencia de las interacciones laterales entre las unidades de fosfolípidos. La estabilización de este sistema se produce principalmente por

dos contribuciones: la hidratación de los grupos funcionales constituyentes de las cabezas polares de los fosfolípidos y la consiguiente interacción de las moléculas de agua de las capas de hidratación con las fases acuosas compartimentalizadas por la membrana y, por otra parte, las interacciones de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas.<sup>[3]</sup> Este tipo de organización está intrínsecamente relacionada con el diseño anfifílico de las moléculas de los fosfolípidos (**Figura 5.2**). Estas moléculas tienen composición variable, pero mayoritariamente consisten en dos cadenas de ácidos grasos esterificadas con una molécula de glicerol, las cuales se unen a un grupo polar mediante un enlace fosfodiéster (**Fig. 5.2a**). Los grupos funcionales de las cabezas polares pueden tener carga positiva (etanolamina, colina, serina), negativa (fosfoderivados) o ser neutros (glicerol) de modo que la carga neta, teniendo en cuenta la carga negativa del grupo fosfato, resulta en general negativa o bien neutra (*zwitterion*). Las cadenas hidrofóbicas pueden tener distintos grados de insaturación, dependiendo de la funcionalidad de la membrana.<sup>[2]</sup>



**Figura 5.2.** Representaciones de una molécula de fosfolípido. a) Fórmula química, donde R es el grupo funcional (etanolamina, colina, serina, glicerol, inositol bifosfato). b) Modelo estructural. c) Esquema habitual que resalta la cabeza polar (celeste) y las cadenas hidrofóbicas (amarillo).

Por su capacidad de autoorganización, los fosfolípidos han atraído la atención en la fabricación de sistemas biomiméticos para el estudio de propiedades básicas de membranas así como soporte de distinto tipo de macromoléculas en dispositivos de sensado, biocatálisis, transporte de fármacos, recubrimiento de implantes, etc.<sup>[4]</sup>



### **5.1.1 Bicapas de fosfolípidos soportadas**

Las bicapas de fosfolípidos pueden ser consideradas como sistemas modelo de las membranas celulares ya que preservan su fluidez bidimensional y pueden ser modificadas con proteínas de membrana, canales iónicos, receptores, transportadores y se pueden emplear en numerosas aplicaciones en el campo de la biotecnología.<sup>[4, 5]</sup> Los liposomas, en los cuales la composición, la estructura y la dinámica de los fosfolípidos pueden ser completamente controladas, son generalmente aceptados como modelos para estudios in vitro de las propiedades y estructura de las membranas celulares.<sup>[6, 7]</sup> Los liposomas son vesículas formadas por un bicapa lipídica, estructuralmente similar a la matriz lipídica de la membrana celular. Sin embargo, para un gran número de técnicas superficiales, como la microscopía de fuerzas atómicas (AFM) que permite el estudio morfológico y de propiedades mecánicas, es imprescindible la inmovilización de las bicapas lipídicas sobre una superficie sólida.<sup>[4, 8, 9]</sup>

Existen distintos métodos para inmovilizar fosfolípidos sobre sustratos sólidos de modo de obtener una bicapa soportada.<sup>[4, 8, 10]</sup> Entre los más ampliamente difundidos se encuentra la transferencia secuencial de dos monocapas desde la interfaz agua/aire por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett (LB) y Langmuir-Schäfer (LS),<sup>[11]</sup> por esparción de bicapas<sup>[12]</sup> y por fusión de vesículas.<sup>[13]</sup> Si bien la transferencia LB provee una primera monocapa de buena calidad, la deposición de la segunda monocapa por esta misma técnica tiene inconvenientes que conllevan el desprendimiento de la primera monocapa depositada. La técnica de Langmuir-Schäfer<sup>[14]</sup> involucra la transferencia de monocapas por deposición horizontal del sustrato paralelo a la superficie de la monocapa, brindando mejores resultados para la transferencia de la segunda capa de fosfolípidos. Esta metodología es muy útil, en especial para la formación de bicapas asimétricas, sin embargo, dado que se requiere un equipamiento especial (balanza de Langmuir-Blodgett) y un riguroso estudio de las condiciones para realizar una transferencia óptima, se han desarrollado estrategias más sencillas. En este sentido, el método de fusión de vesículas es el más ampliamente utilizado. Esta metodología, que involucra la adhesión y ruptura de las vesículas preformadas sobre una superficie suficientemente hidrofílica, será discutida en detalle en la siguiente sección.

Las membranas lipídicas soportadas sobre superficies de materiales inorgánicos, como oro, vidrio y mica, permiten por un lado obtener valiosa información relacionada con

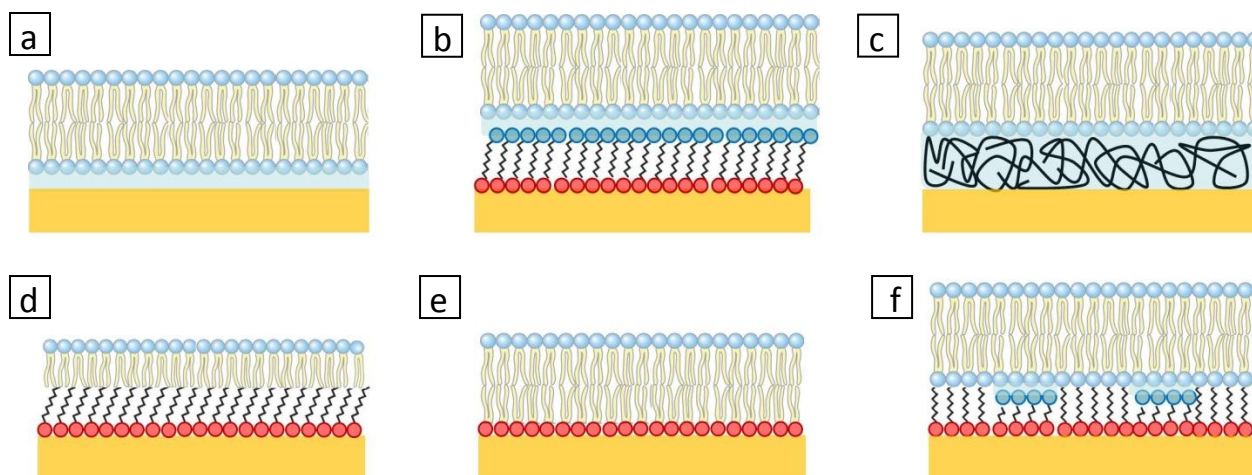
la transición de fase, la estabilidad y la morfología de las capas y se las considera como estructuras prometedoras para el desarrollo de biosensores.<sup>[4, 8, 15]</sup> No obstante, las propiedades fisicoquímicas de las capas lipídicas sobre esta superficies son significativamente diferentes respecto de las membranas en su entorno natural fluido.<sup>[16, 17]</sup> Las monocapas autoorganizadas (SAMs) de alcanotioles constituyen una alternativa interesante para sortear este inconveniente, ya que actúan como un puente o espaciador que integra a la superficie inorgánica al ensamblado de las biomoléculas. La modificación de superficies metálicas con un espaciador molecular capaz de unirse a fosfolípidos de modo de formar bicapas permite alojar dominios hidrofílicos de proteínas o bien posibilita la transferencia de carga de un lado a otro de la membrana.<sup>[18, 19]</sup> En este sentido, existe un gran interés en soportar sistemas de bicapa en sustratos metálicos debido a que permite integrarlos a la amplia familia de los ya bien conocidos sensores electroquímicos.

Entre los sustratos metálicos, el oro es particularmente atractivo ya que es un material biocompatible e inerte y puede ser modificado por simple química de solución sin contaminaciones significativas. Se han empleado distintas estrategias para soportar bicapas de fosfolípidos sobre oro (**Figura 5.3**), las cuales de acuerdo a su diseño poseen distintas características respecto a su capacidad de barrera semipermeable y a la fluidez lateral de la bicapa, las cuales son propiedades fundamentales de las membranas biológicas.

Es posible formar bicapas directamente sobre la superficie de oro (**Fig. 5.3a**) mediante la combinación de técnicas LB y LS.<sup>[20]</sup> Por el contrario, se ha observado que la fusión espontánea de vesículas sobre esta superficie no es exitosa debido a su pobre hidrofiliidad.<sup>[21, 22]</sup> En efecto, si bien las vesículas consiguen adherirse, es necesario inducir la fusión mediante algún paso adicional. Así, el grupo de Lipkowski ha obtenido la fusión de vesículas sobre oro mediante la aplicación de un potencial en la superficie.<sup>[23, 24]</sup>

Otra estrategia para lograr la fusión consiste en modificar adecuadamente la superficie del oro aumentando su hidrofiliidad. Como se discutió en el Capítulo 3, el oro puede ser recubierto con SAMs de alcanotioles con funcionalidad hidrofílica (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>) de modo de proporcionar una superficie apta para la fusión de vesículas (**Fig. 5.3b**). Algunos autores<sup>[25, 26]</sup> han reportado resultados favorables empleando SAMs de tioles de cadena larga (C<sub>n</sub> > 11) ya sea utilizando una única funcionalidad o bien una mezcla de ellas (SAMs mixtas). Otro ejemplo en esta dirección es la modificación de la superficie con polímeros<sup>[27]</sup>

(Fig. 5.3c), de modo de imitar ya sea el citoesqueleto o bien la matriz extracelular, un ambiente más similar al entorno natural de las bicapas lipídicas.



**Figura 5.3.** Modelos de bicapas lipídicas soportadas sobre oro. a) Bicapas sobre oro con capa de hidratación intermedia, b) bicapas sobre alcanotioles con grupos terminales hidrofílicos, c) bicapas sobre polímeros, d) bicapas híbridas alcanotiol/fosfolípido, e) bicapas híbridas tiofosfolípido/fosfolípido y f) bicapas “ancladas”. En rojo se muestran los grupos tiol, en azul los grupos polares y en amarillo el sustrato de oro.

En los modelos planteados hasta el momento (Fig. 5.3 a-c), las bicapas se encuentran “libres”, es decir, no poseen una conexión covalente con el sustrato, existiendo una capa de hidratación de  $\sim 10 \text{ \AA}$  entre la bicapa y el sustrato.<sup>[15]</sup> Para algunos estudios o aplicaciones, es necesario contar con una bicapa que actúe como barrera para la permeación de iones inorgánicos, lo cuales podrían difundir a través de la capa de hidratación. Con este objetivo se desarrollaron bicapas “híbridas”, las cuales cuentan con una SAM que expone una superficie hidrofóbica a la cual se le deposita una monocapa de fosfolípidos ya sea por la técnica LB o LS o bien por fusión y ruptura de vesículas.<sup>[15]</sup> Las SAMs pueden ser de alcanotioles<sup>[28]</sup> (Fig. 5.3d), típicamente de  $C_n > 12$  para minimizar los defectos expuestos en la superficie. En otros casos, con el fin de lograr mayor “biosimilitud” en cuanto a la interacción entre cadenas hidrofóbicas, se puede recurrir al empleo de SAMs de tiofosfolípidos<sup>[29]</sup> (Fig. 5.3e), que consisten en moléculas de fosfolípidos a las cuales se les ha añadido un grupo tiol por medio de síntesis orgánica. En ambos casos (Fig. 5.3 d-e), la fluidez lateral de la bicapa se ve comprometida respecto de los modelos de bicapa “libre” (Fig. 5.3 a-c), ya que la monocapa inferior está fuertemente restringida por el sustrato. Un modelo más versátil está constituido por las bicapas “ancladas”<sup>[30]</sup> (Fig. 5.3f), el cual posee una SAM

completa o mixta de tiofosfolípidos de espaciador largo. Las SAMs mixtas poseen además de estos tiofosfolípidos, alcanotioles de funcionalidad hidrofílica de modo que la bicapa sólo está conectada por algunas zonas al sustrato, conservando así la fluidez lateral y algunos reservorios de solvente de hidratación.

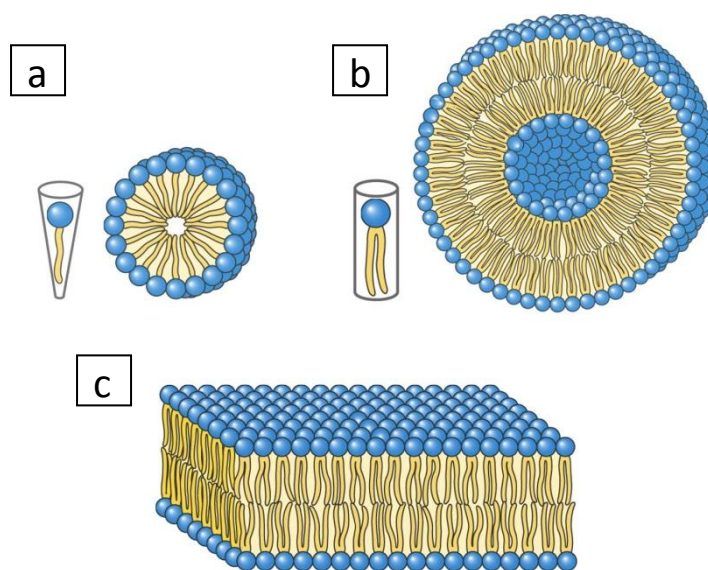
El empleo de un espaciador de cadena larga en sensores de tipo electroquímico, como los que se muestran en la **Fig. 5.3b,d-f**, trae como consecuencia una disminución considerable en la eficiencia de la transferencia de electrones entre el sustrato y las especies electroactivas que se deseen detectar.<sup>[31]</sup> Por lo tanto, el uso de un espaciador de cadena corta que torne la superficie del oro lo suficientemente hidrofílica para permitir la fusión de vesículas y que a su vez no constituya una barrera para la transferencia de electrones sería la opción más atractiva para construir un biosensor electroquímico.

Desafortunadamente, las SAMs de alcanotioles de cadena corta, como el 2-mercaptoetanol,<sup>[32]</sup> el ácido mercaptoacético<sup>[32]</sup> o la cisteamina,<sup>[33]</sup> tienen una baja estabilidad respecto de la desorción reductiva lo que estrecha su rango de uso en relación a su empleo al sensado electroquímico. Por el contrario, las SAMs de ditiotreitól (DTT) estudiadas en el Capítulo 3 poseen una mayor estabilidad y son adecuadas para estudios de transferencia de carga según se constató en el Capítulo 4. En este capítulo demostraremos que las SAMs de DTT sobre oro también proveen una superficie adecuada para la formación de bicapas por fusión de vesículas siendo pues una buena alternativa para la construcción de sensores electroquímicos.

### **5.1.2 Fusión de vesículas**

Cuando una suspensión de fosfolípidos se dispersa mecánicamente en una solución acuosa, éstos pueden autoorganizarse en distintas formas esféricas, como micelas o liposomas, o bien formando láminas de bicapas (**Figura 5.4**). El tipo de estructura alcanzada por un fosfolípido puro o bien por una mezcla de ellos depende de diversos factores incluyendo la longitud y número de cadenas de ácidos grasos, el grado de insaturación y la temperatura.<sup>[2]</sup> En estas estructuras, el efecto hidrofóbico causa que las cadenas de ácidos grasos se agreguen y excluyan a las moléculas de agua del interior.<sup>[3]</sup> La formación de micelas (**Fig. 5.4a**) está favorecida cuando la sección transversal del grupo cabeza polar es mayor que

la región lipídica, como ocurre con los lisofosfolípidos que poseen sólo una cadena hidrocarbonada. La mayor parte de los fosfolípidos presentes en las células, en los cuales las secciones transversales polares e hidrofóbicas son similares, forman espontáneamente bicapas de aproximadamente 3 nm de espesor<sup>[34]</sup> (**Fig. 5.4c**). Para evitar que las regiones hidrofóbicas expuestas en los bordes estén en contacto con el agua, las bicapas se pliegan para formar vesículas esféricas con un compartimiento acuoso en su interior (**Fig. 5.4b**).



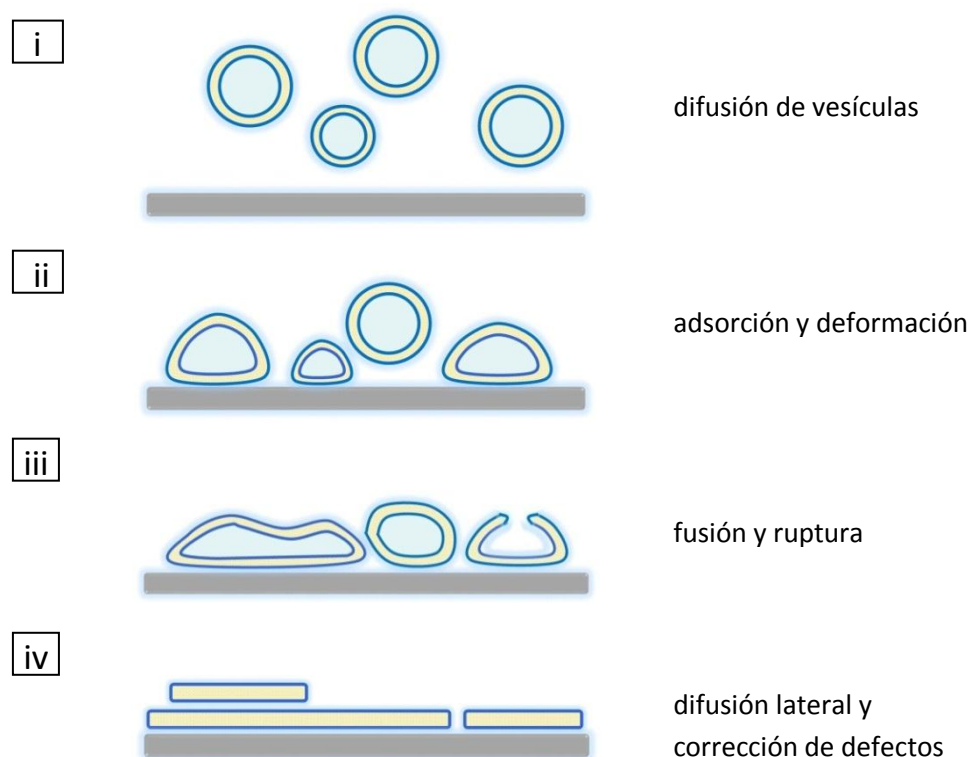
**Figura 5.4.** Vistas transversales de estructuras formadas por fosfolípidos. a) Micela, b) vesícula o liposoma y c) bicapa lipídica. (Adaptado de *Lehninger Principles of Biochemistry* 5 ed. [34]).

El tamaño de las vesículas depende de su forma de preparación, con diámetros que varían desde 25 nm<sup>[35]</sup> hasta cientos de micrones (vesículas gigantes).<sup>[36]</sup> La lamelaridad, que se refiere al número de bicapas contenidas en una única vesícula, es una propiedad que también está controlada por el método de preparación.<sup>[37]</sup> Algunos métodos favorecen la producción de vesículas unilamelares mientras que otros resultan en la formación de vesículas con estructura de múltiples capas concéntricas (como una cebolla) denominadas multilamelares. Las vesículas multilamelares son las más sencillas de fabricar y poseen entre 0,1 y 10  $\mu\text{m}$  y consisten en 5 o más bicapas concéntricas.<sup>[37]</sup> A partir de estas vesículas pueden obtenerse vesículas unilamelares sometiéndolas a agitación por vortex o sonicación, extrusión a través de filtros de policarbonato, ciclos de enfriamiento/calentamiento, inyección de etanol o uso de detergentes, entre otros.<sup>[37]</sup>

La fusión de membranas biológicas es un proceso espontáneo, aunque altamente regulado, que involucra la unión de dos vesículas separadas y la mezcla de su contenido acuoso.<sup>[38]</sup> Dado que dichas vesículas son entidades estables, para que esta unión tenga lugar debe producirse un grado de estrés en la curvatura, tal que el nuevo sistema posea un nivel energético menor. En las células este proceso está mediado por péptidos y proteínas que promueven la agregación y el reordenamiento de la bicapa.<sup>[38]</sup>

En contacto con un sustrato, el cambio en la forma de una vesícula adsorbida se puede comparar con la gota de un líquido adhiriéndose a una superficie. Una forma simple de evaluar la unión y la estabilidad de las vesículas adsorbidas en la superficie fue desarrollada teóricamente por Seifert y Lipowsky.<sup>[39]</sup> Estos autores proponen que el balance entre el aumento en la energía de adhesión (determinada por el área de adhesión) y el costo energético en la curvatura de las vesículas (dado por la flexibilidad de la bicapa) determina la adsorción, la deformación y la ruptura de las vesículas.

A través de numerosas observaciones experimentales con distintas técnicas, entre las cuales caben destacar la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)<sup>[22]</sup> y AFM,<sup>[40]</sup> se puede describir el mecanismo de fusión de vesículas en una serie de pasos resumidos en la **Figura 5.5**.



**Figura 5.5.** Mecanismo propuesto para la fusión de vesículas sobre una superficie.

Inicialmente las vesículas difunden desde la solución próxima a la superficie (**Fig. 5.5i**), con un coeficiente de difusión que puede ser aproximado por el modelo de Stokes-Einstein<sup>[41]</sup> para la difusión de esferas rígidas. Una vez cerca de la superficie comienza la adsorción y procede hasta alcanzar una concentración crítica de vesículas adheridas (**Fig. 5.5ii**). Esencialmente, este requerimiento refleja la deformación de las vesículas debido a la adsorción y las interacciones estéricas entre ellas. La disminución en el radio de curvatura en los bordes de la zona de adhesión inicia un mecanismo de formación de poros que se propagan por la acción “catalítica” de los extremos hidrofóbicos provocando la unión de vesículas vecinas o bien la apertura de las mismas (**Fig. 5.5iii**). Las vesículas rotas difunden cerca de la superficie y su coeficiente de difusión ya no puede ser aproximado por el modelo de Stokes-Einstein ya que está afectado por las fuerzas atractivas de la superficie. Finalmente las islas de bicapas difunden lateralmente para minimizar la exposición de bordes hidrofóbicos, así como más vesículas pueden adsorberse de modo de cubrir por completo la superficie (**Fig. 5.5iv**).

Para completar esta simple descripción resta mencionar el efecto cooperativo entre vesículas vecinas así como la distribución dinámica de las especies lipídicas. Para la formación de bicapas es necesaria una concentración crítica, debajo de la cual las vesículas permanecen intactas.<sup>[42]</sup> Este efecto es independiente del tamaño de las vesículas y está más bien relacionado con las interacciones estéricas (empaquetamiento de vesículas) que promueven su deformación.<sup>[43]</sup> Una vez superado este valor crítico, la cinética de la fusión dependerá de la naturaleza del fosfolípido, o la mezcla de fosfolípidos si es el caso, siendo la temperatura y la presión osmótica los factores que más afectarán la velocidad del proceso.<sup>[43]</sup> Durante la fusión pueden ocurrir fenómenos de redistribución de las moléculas de fosfolípidos, pero en general, la mayor parte de las moléculas presentes en la superficie externa de la bicapa soportada son aquellas que se encontraban en la capa interna de la vesícula.<sup>[44]</sup>

Por último, el papel que juega el soporte sólido es el más debatido en la literatura, en particular su importancia en determinar la eficacia para la formación de las bicapas. Diferentes trabajos señalan que la hidrofiliidad es necesaria<sup>[45]</sup> pero no una condición suficiente para favorecer la ruptura de las vesículas. Entre los sustratos más comúnmente empleados se encuentran la mica y los materiales derivados del silicio como el vidrio, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> o

SiO<sub>2</sub>.<sup>[45]</sup> El estado de hidroxilación de las superficies de SiO<sub>2</sub> varía considerablemente en función del tratamiento de la superficie tal como la exposición a altas temperaturas o a soluciones básicas, influyendo la carga y otras propiedades fisicoquímicas del soporte, así como también creando heterogeneidades locales que se transmiten a la bicapa soportada.<sup>[45]</sup> Respecto de la rugosidad de la superficie, además de la formación sobre superficies atómicamente planas como la mica, es notable la formación de bicapas sobre sustratos de extrema rugosidad y porosidad en la nanoescala.<sup>[46-48]</sup>

### **5.1.3 Objetivos del presente capítulo**

Se buscará promover la fusión de vesículas de DMPC sobre la superficie hidrofílica provista por las SAMs de DTT sobre sustratos de oro con terrazas (111), policristalinos y nanoestructurados. La caracterización de las bicapas sobre sustratos planos se llevará a cabo mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM) in situ. Además de esta técnica local, se evaluará globalmente la fluidez y la presencia de defectos mediante el uso de dos sondas moleculares. Como sonda de fluidez se empleará el azul de metileno (MB), que es capaz de intercalarse entre cadenas hidrocarbonadas (Capítulo 4). Por otro lado, el dinucleótido de Flavina-Adenina (FAD), que posee un carácter más hidrofílico y sólo puede detectarse si existen defectos en la barrera (Capítulo 4), permitirá evaluar la presencia de poros o discontinuidades en la bicapa. En último lugar, se utilizarán vesículas de DMPC a las cuales se les incorporó durante su preparación una molécula hidrofóbica (ftalocianina de Zn) con propiedades ópticas y redox, analizando sus características para la transferencia de carga y su posible cuantificación mediante métodos electroquímicos.

## **5.2 Experimental**

### **5.2.1 Sustratos de oro**

Se utilizaron películas delgadas de Au evaporado sobre vidrio borosilicato “Robax” provistas por la firma Arrandee® de Werther, Alemania. Estas placas de oro se sometieron a un tratamiento térmico con llama de gas butano o hidrógeno para obtener la orientación preferencial (111), como ya se describió en el Capítulo 3 (sección 3.2.1), así como algunas de



ellas se emplearon sin el tratamiento térmico (policristalinas). Para estudios de espectroscopía Raman amplificada por superficies (SERS), se emplearon sustratos de oro nanoestructurados preparados en el laboratorio mediante un método electroquímico,<sup>[49]</sup> según se describió en el Capítulo 4 (sección 4.2.1).

### **5.2.2 Reactivos**

El ditiotreitól (DTT), el ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES) y el dinucleótido de Flavina-Adenina (FAD) fueron adquiridos de la marca Sigma. La dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) se adquirió de Avanti Polar Lipids y el azul de metileno (MB) se adquirió de Merck (grado Reag. Ph Eur). El 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis[(N,N-dimetilamino)etilsulfanil]ftalocianinato de Zinc (II) (ZnPc) fue provisto y sintetizado por la Ing. Virginia Diz (perteneciente al grupo de Fotoquímica del Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física de INQUIMAE-UBA) según métodos descriptos en literatura.<sup>[50]</sup> El resto de los reactivos y solventes empleados fueron del mejor grado analítico disponible. Para las soluciones acuosas se empleó siempre agua MilliQ (18,2 MΩ).

### **5.2.3 Preparación de SAMs de DTT**

Las SAMs de DTT se formaron por inmersión de las placas de Au en soluciones etanólicas 5mM durante 30 min a 60 °C. Después de este periodo, se las enjuagó con abundante etanol absoluto. Los restos de solvente se removieron por secado en un flujo de N<sub>2</sub>.

### **5.2.4 Preparación de vesículas de DMPC**

Las vesículas de DMPC se obtuvieron a partir de una solución de fosfolípido 10 mg/mL en cloroformo. El solvente se evaporó bajo una corriente de nitrógeno para formar una película sobre las paredes de un balón de vidrio. Las trazas de solvente restantes se eliminaron dejando el recipiente en un desecador conectado a una bomba de vacío. La película seca se reconstituyó con buffer HEPES 10 mM + NaCl 0,9% pH 7,4 y se sometió a agitación con vortex. La mezcla de vesículas multilamelares así obtenida, se sonicó brevemente y se pasó por un filtro de policarbonato de 400 nm de poro (Nuclepore) para formar vesículas unilamelares.

Las vesículas de DMPC conteniendo ZnPc se obtuvieron con un procedimiento similar excepto que a la solución de fosfolípido inicial se le añadió ZnPc disuelta en tetrahidrofurano (THF) ( $\sim 0,8 \mu\text{g ZnPc/g DMPC}$ ). Para separar las moléculas de ZnPc libres de las vesículas unilamelares se realizó una cromatografía por permeación en gel en una columna de Sephadex G-50 usando el método de centrifugación en mini-columna.<sup>[50]</sup> La preparación de estas vesículas y su caracterización fotoquímica estuvieron a cargo de la Ing. Virginia Diz.

#### **5.2.5 Preparación de bicapas de DMPC**

Los sustratos de Au con o sin una SAM de DTT se sumergieron en una suspensión 10 mg/mL de vesículas unilamelares de DMPC durante al menos 90 min a 30 °C – 37 °C para permitir la fusión de vesículas. Luego de este periodo las placas se enjuagaron repetidas veces con buffer HEPES 10 mM + NaCl 0,9% para remover el material sin unir.

También se emplearon como sustratos para la formación de bicapas discos de 9,5 mm de diámetro de mica muscovita de grado V-1 (la más alta calidad disponible) de SPI Supplies®. Los sustratos de mica fueron exfoliados por eliminación de las capas superiores con una cinta adhesiva e inmediatamente sumergidos en la suspensión de vesículas.

Los sustratos modificados no se secaron bajo corriente de N<sub>2</sub> para evitar la posible ruptura o deformación de las bicapas y conservaron su humedad superficial durante su manipulación al aire. Para las medidas electroquímicas, a los sustratos de oro se les soldó previamente un alambre de oro que sirvió como contacto eléctrico, y este sí se secó mediante un papel absorbente antes de su conexión a la celda electroquímica.

#### **5.2.6 Medidas de AFM y STM**

Las medidas de AFM en modo contacto se llevaron a cabo en un microscopio PicoScan (Molecular Imaging) dentro de una celda de fluidos con control de temperatura (in situ), conteniendo buffer HEPES 10 mM + NaCl 0,9% pH 7,4. Se emplearon puntas de Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (cantilevers triangulares con constante elástica 0,12 N/m, Veeco Probes). Las imágenes se analizaron usando el programa VS x M 2,1 (Nanotec Electrónica).

Se realizaron además medidas in situ a temperatura ambiente en un microscopio Nanoscope V (Digital Instruments, Inc.) también en modo contacto, empleando también

puntas de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (cantilevers triangulares de 0,12 N/m, Veeco Probes). El programa de análisis de las imágenes fue el provisto por la empresa fabricante (versión 7.30).

Las medidas de STM se realizaron con un microscopio Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Inc.), empleando puntas comerciales de Pt/Ir y *scanners* que permiten barrer un campo máximo de unos 10  $\mu\text{m}$ . Se usaron voltajes túnel  $V_T$  positivos entre 0,1 y 0,5 V y corrientes de 0,5 - 1 nA. También en este caso se empleó el programa provisto por Veeco (versión 7.30).

### **5.2.7 Medidas electroquímicas**

Las medidas de voltamperometría cíclica se realizaron con un potenciostato con capacidad de adquisición digital de datos. Se empleó una celda electroquímica de vidrio de tres electrodos. Como referencia se utilizaron electrodos de calomel saturado (SCE) y de Ag/AgCl preparados en el laboratorio, cuyos valores fueron contrastados con un SCE comercial de la marca Metrohm. El contraelectrodo fue una lámina de Pt de gran área y como electrodos de trabajo se emplearon las placas de Au modificadas. Las soluciones electrolíticas utilizadas consistieron en buffer fosfato 0,1 M pH 7,4 y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M, todas desoxigenadas mediante burbujeo de  $\text{N}_2$  antes de medir. Además se utilizaron soluciones acuosas mixtas de FAD y MB en buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4.

Todas las medidas están expresadas en densidad de corriente ( $j$ ) respecto del área electroquímica del electrodo de oro, calculada a partir del pico de reducción del óxido de oro,<sup>[51]</sup> excepto en las medidas de cuplas redox en solución donde se refirieron al área geométrica. Los voltamperogramas cíclicos que se muestran en este capítulo son representativos del comportamiento promedio observado mientras que los datos de densidad de carga son resultado del promedio de al menos 5 medidas independientes.

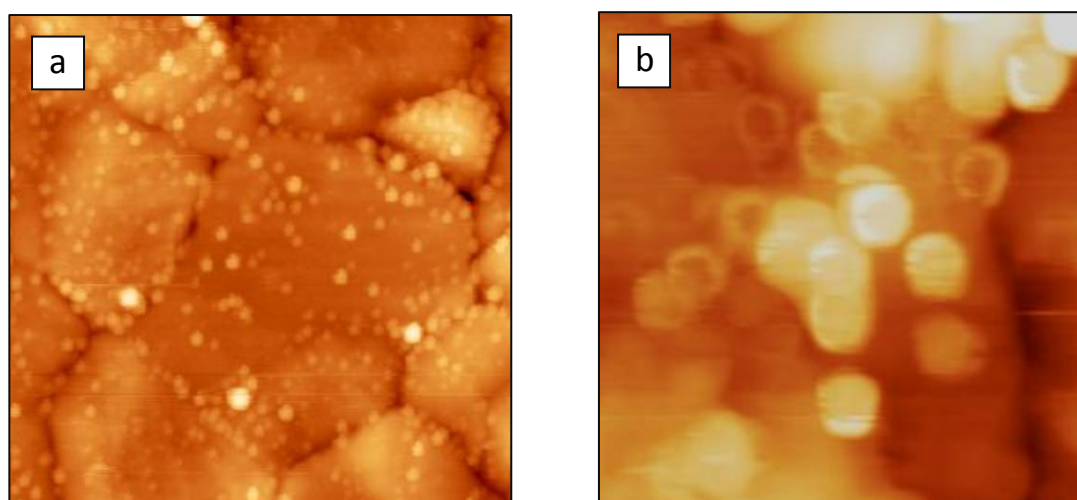
### **5.2.8 Medidas de SERS**

Se hicieron medidas de Raman ex situ e in situ en un espectrómetro triple Jobin–Yvon T64000 operando en modo sustractivo y equipado con un dispositivo acoplado para enfriamiento con  $\text{N}_2$  líquido. Las moléculas se excitaron con un laser de iones Ar-Kr empleando energías entre 1,834 eV (676 nm) y 2,707 eV (458 nm). Típicamente se usaron potencias de 10 mW concentradas en una línea de foco de 7 mm de largo y ~100 mm de

profundidad para evitar la degradación de las muestras inducida por fotones. Esta degradación (*photobleaching*) fue siempre  $< 5\%$  después de 100 s de adquisición de datos. Para evitar la acumulación de este efecto, se tomaron espectros en diferentes zonas de la muestra. Además, antes de cada medida se hicieron mapas espectrales de toda la superficie con bajas potencias y tiempos cortos de adquisición para excluir zonas de intensidades Raman demasiado distintas al valor promedio.

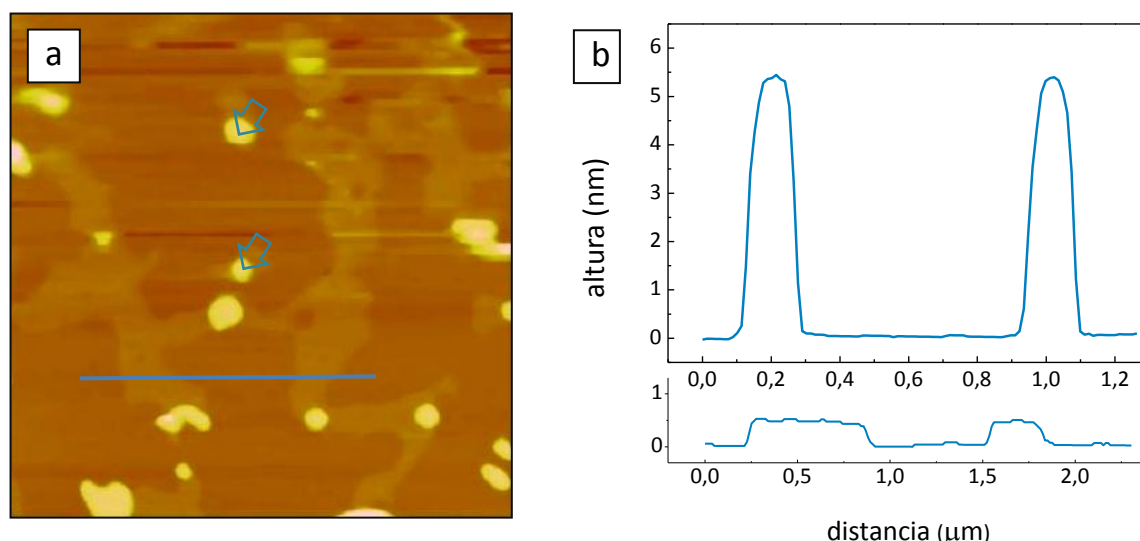
### 5.3 Fusión de vesículas de DMPC sobre SAMs de DTT

Si se pone en contacto una suspensión de vesículas de DMPC sobre sustratos de oro orientados (111) durante 3 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  se puede observar que simplemente se adsorben sobre la superficie (**Figura 5.6**). Las imágenes de AFM in situ (**Fig. 5.6a**) muestran vesículas de entre 100 y 200 nm distribuidas al azar en la superficie del oro, con alguna acumulación preferencial en los bordes de grano. Si se examina con mayor detalle (**Fig. 5.6b**), además de la sección circular, algunas de ellas aparecen deformadas en el centro por la interacción con la punta. Esta apariencia cóncava ha sido pocas veces reportada<sup>[52]</sup> y denota la elasticidad de las vesículas. Es necesario aplicar fuerzas mayores para formar poros e inducir su ruptura mecánica.



**Figura 5.6.** a) Imagen de AFM in situ en modo contacto de  $4,5\text{ }\mu\text{m} \times 4,5\text{ }\mu\text{m}$  de la superficie de Au(111) después de la inmersión en una suspensión de vesículas de DMPC durante 3 h ( $Z = 100\text{ nm}$ ). b) Imagen de  $1,5\text{ }\mu\text{m} \times 1,5\text{ }\mu\text{m}$  donde se pueden observar en detalle las vesículas, algunas aparecen deformadas por la interacción con la punta ( $Z = 40\text{ nm}$ ).

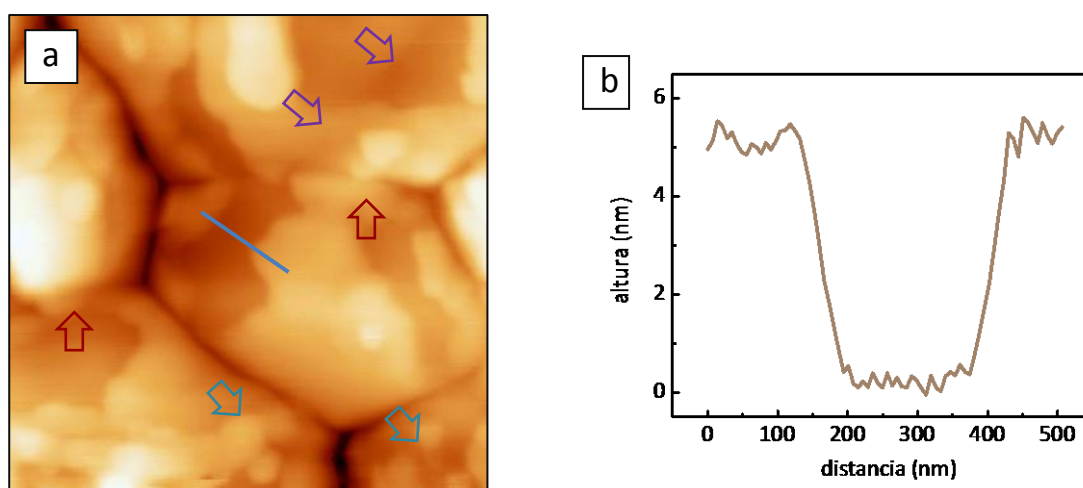
Por otro lado, si la suspensión de vesículas se pone en contacto durante 60 min a 30 °C con una superficie de mica recién exfoliada el comportamiento difiere respecto de la superficie de oro (**Figura 5.7a**). La mica es una superficie plana a nivel atómico y según se discutió en la sección 5.1.2 su química superficial permite la formación de bicapas por fusión espontánea de vesículas.<sup>[53]</sup> La imagen de AFM in situ muestra una zona completamente cubierta por una bicapa de DMPC sobre la cual se pueden apreciar algunas vesículas deformadas y parches de bicapa (algunas de ellas señaladas con flechas en la **Fig. 5.7a**) cuyo perfil característico se muestra en la **Fig. 5.7b**. Estas vesículas y parches adicionales que forman multicapas pueden ser removidos por enjuagues adicionales ya que se encuentran débilmente adsorbidos sobre la cara superior de la bicapa soportada sobre la mica.



**Figura 5.7.** a) Imagen de AFM in situ en modo contacto de 4 μm x 4 μm de la superficie de mica después de la inmersión en una suspensión de vesículas de DMPC durante 60 min ( $Z = 10$  nm) tomada a ~25 °C. b) Perfiles de altura de los discos de bicapas (*sup.*) y de dominios de diferente fase para la traza horizontal en a) (*inf.*).

En la bicapa inferior, en contacto con la superficie de mica, pueden observarse zonas con distinto contraste (**Fig. 5.7a**), cuya diferencia de altura es de tan sólo 0,5 nm. Estas zonas corresponden a dominios de distintas fases para DMPC, cuya proporción depende de la temperatura. Por debajo de los 22 °C, la bicapa se encuentra puramente en estado “gel” (mayor altura) mientras que por encima de los 32 °C, la fase predominante es “líquida” (menor altura).<sup>[53]</sup> Por lo tanto, a la temperatura en que se tomó la imagen (~ 25 °C) se puede observar una coexistencia entre ambas fases.

Para formar bicapas sobre la superficie de Au(111) modificado con una SAM de DTT se empleó el mismo procedimiento que el seguido para la formación de bicapas a partir de fusión de vesículas sobre mica (60 min de inmersión a 30 °C). La superficie de Au de esta manera expone grupos –OH según se discutió en el Capítulo 3, ofreciendo una superficie hidrofílica que podría permitir la fusión. La **Figura 5.8a** muestra la formación de parches de bicapas cuyo perfil de altura característico (**Fig. 5.8b**) corresponde a ~ 5nm. Este valor está de acuerdo a los datos de espesor de bicapa de DMPC reportados en literatura, los cuales oscilan entre 4,2 - 5 nm.<sup>[53, 54]</sup> En la zona inferior de la imagen seleccionada puede apreciarse además algunas vesículas en proceso de fusión (indicadas con flechas celestes en la **Fig. 5.8a**).

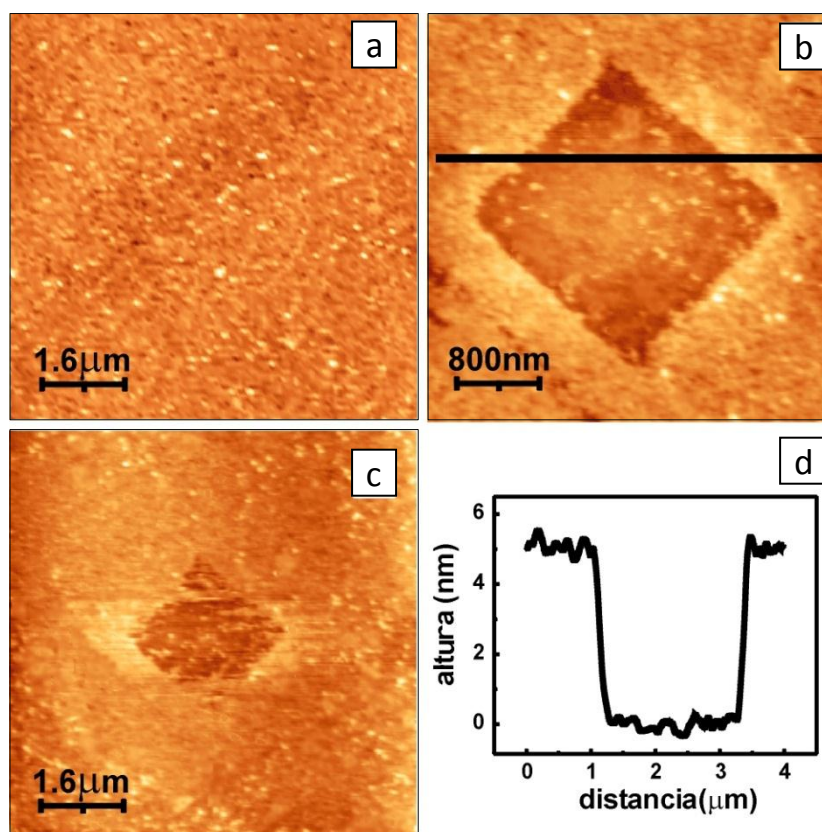


**Figura 5.8.** a) Imagen de AFM in situ en modo contacto de 2,5  $\mu\text{m}$  x 2,5  $\mu\text{m}$  de la superficie de Au(111) modificada con una SAM de DTT después de la inmersión en una suspensión de vesículas de DMPC durante 60 min ( $Z = 20$  nm) tomada a 22 °C. b) Perfil de altura de la bicapa de DMPC para la traza mostrada en a).

Por otro lado, se seleccionó una zona totalmente cubierta por la bicapa y se le aplicó a un sector de 1  $\mu\text{m}$  x 1  $\mu\text{m}$  una fuerza mayor con la punta del AFM de modo de remover el material (zona superior derecha de la **Fig. 5.8a**). Para llevar a cabo este procedimiento se barrió al menos 5 veces la zona a ~ 18 °C, de modo de favorecer la fase “gel” y disminuir la difusión lateral de la bicapa. Esta zona “limpia” revela un escalón (indicado con la flecha superior violeta) cuya topografía se transmite a la bicapa de DMPC (flecha inferior violeta). Sin embargo, los bordes de grano constituyen grietas profundas en las cuales la bicapa podría discontinuarse. Algunos de estos bordes aparecen cubiertos (indicados con flechas

rojas en la **Fig. 5.8a**), no obstante en la mayoría de los bordes evaluados la bicapa pareciera interrumpirse.

Si bien es evidente que la SAM de DTT favorece la formación de las bicapas (comparando la **Fig. 5.8** con la **Fig. 5.6**) se intentó mejorar el cubrimiento de la superficie por la bicapa aumentando el tiempo de contacto del sustrato con la suspensión de vesículas a 90 min y la temperatura a  $\sim 37^\circ\text{C}$ . Además, se sustituyó el sustrato tratado térmicamente por el oro sin tratamiento térmico para eliminar el efecto observado en los borde de grano. En la **Figura 5.9a** se puede observar el resultado para la bicapa de DMPC formada sobre un sustrato de oro policristalino modificado con una SAM de DTT.



**Figura 5.9.** Imágenes de AFM en modo contacto de la bicapa de DMPC formada sobre la SAM de DTT sobre oro policristalino. a) Área de  $7,5\ \mu\text{m} \times 7,5\ \mu\text{m}$  cubierta con la bicapa lipídica a  $18^\circ\text{C}$  ( $Z = 10\ \text{nm}$ ). b) Ventana cuadrada de  $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$  definida por la remoción de la bicapa por medio de la punta de AFM a  $18^\circ\text{C}$ . c) Bicapa de DMPC volviendo a cubrir la superficie de la ventana cuadrada, tomada 120 s después de la imagen en b) a  $20^\circ\text{C}$ . d) Perfil de la sección transversal correspondiente a la traza de la imagen en b).

En todas las zonas examinadas se pudo observar un cubrimiento completo de la superficie, es decir, con ausencia de discontinuidades. Para demostrar la presencia de la

bicapa se recurrió al procedimiento de remoción de una zona de la misma abriendo una ventana con la punta del AFM de modo de evaluar el espesor (**Fig. 5.9b**). El perfil de altura (**Fig. 5.9d**) revela un espesor similar al hallado en la superficie del Au(111) modificado (**Fig. 5.8b**). Al retornar a la zona de la imagen inicial (**Fig. 5.9a,c**), aumentando paulatinamente la temperatura, se puede observar cómo la zona removida comienza a cubrirse por difusión lateral impulsada por el efecto hidrofóbico, la cual en parte está favorecida por el movimiento de la punta al tomar la imagen. La ventana formada no llega a cerrarse completamente ya que la difusión está autolimitada debido a que se perderían las interacciones intermoleculares en el resto de la bicapa y no hay disponible material adicional para volver a cubrir por completo esta zona.

Se utilizaron las medidas de AFM a fin de estimar un coeficiente de difusión de la bicapas sobre el sustrato de DTT-oro mediante la toma secuencial de imágenes cronometrada, previamente a que cese por completo el movimiento lateral. La relación de Einstein para la difusión de fluidos interfaciales<sup>[55]</sup> establece:

$$D = \frac{x^2}{2\Delta t} \quad (5.1)$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión para un desplazamiento neto  $x$  en un intervalo de tiempo  $\Delta t$ . Siguiendo el frente de desplazamiento para imágenes tomadas a distintos tiempos se obtiene un valor promedio  $D \approx 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , que es comparable al estimado por medidas de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*, recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo) para liposomas de DMPC marcados con sondas fluorescentes, con valores de  $1,5 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  a  $9,6^\circ \text{C}$  y  $2,0 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  a  $22,5^\circ \text{C}$  sobre sustratos de vidrio.<sup>[56]</sup>

#### 5.4 Interacción con MB y FAD

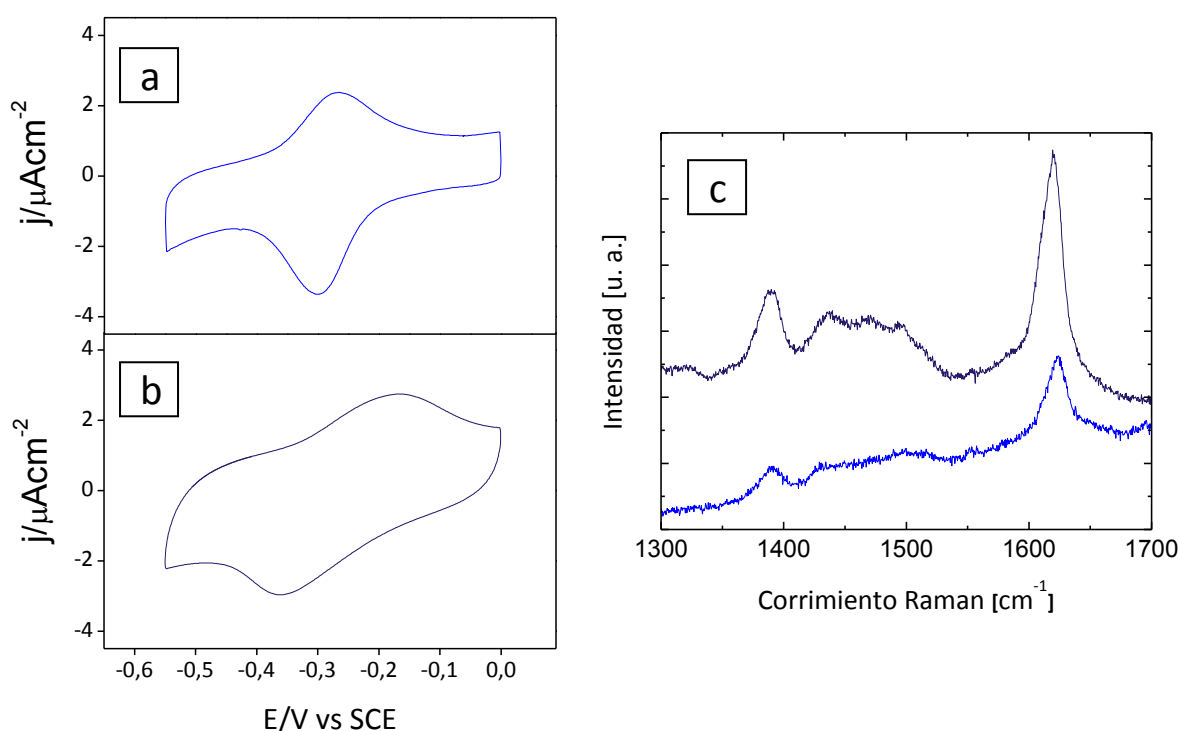
En la sección 5.3 se demostró mediante medidas de AFM la formación de una bicapa fluida de DMPC sobre los sustratos de oro modificados con una SAM de DTT. Sin embargo, si bien valiosa, esta técnica sólo brinda información local. Por lo tanto para caracterizar las



propiedades promedio de la bicapa recurriremos a medidas electroquímicas utilizando sondas moleculares.

En primer término se evaluarán las características de fluidez utilizando moléculas lipofílicas. Tal como se comentó en el Capítulo 4 (sección 4.1.2), el azul de metileno (MB) es capaz de difundir a través de membranas biológicas así como a través de la bicapa de vesículas unilamelares de DOPC (dioleoilpalmitoilcolina).<sup>[57]</sup> Por lo tanto, el MB debería ser capaz de difundir a través de nuestro sistema modelo de bicapa, si ésta retiene su fluidez lateral.

La **Figura 5.10a** muestra un voltamperograma cíclico de MB inmovilizado en una SAM de DTT sobre un sustrato de Au(111) mediante inmersión del sustrato en una solución acuosa de MB 100  $\mu\text{M}$  durante 30 min, tal como se describió en el Capítulo 4.



**Figura 5.10.** Voltamperogramas cíclicos de MB inmovilizado sobre Au(111) modificado con a) DTT y b) DMPC-DTT realizados en buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 a  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . c) Espectros SERS ex situ correspondientes a MB inmovilizado sobre DTT (inf.) y DMPC-DTT (sup.) sobre Au(111) tomados con un laser de excitación de 568 nm, un tiempo de adquisición de 120 s y 10 mW de potencia. La inmovilización de MB se efectuó en todos los casos con  $t_i^{\text{MB}} = 30 \text{ min}$  en solución acuosa  $100 \mu\text{M}$ .

Mediante el mismo procedimiento de inmovilización de MB, empleando los sustratos modificados con bicapas de DMPC sobre SAMs de DTT, la cupla redox detectada exhibe un

comportamiento marcadamente distinto (**Fig. 5.10b**), con una amplia separación en los  $E_p$  de oxidación y reducción. Por otro lado, las cargas asociadas a los picos de reducción ( $4,1 \mu\text{C cm}^{-2}$ ) y oxidación ( $4,6 \mu\text{C cm}^{-2}$ ) son comparables a la halladas para MB sobre la SAM de DTT ( $5,7$  y  $4,2 \mu\text{C cm}^{-2}$ , respectivamente). La carga calculada corresponde a aquellas moléculas que fueron capaces de transferir electrones al sustrato de oro. Para verificar si estas moléculas corresponden a la totalidad de MB inmovilizado en el sistema de bicapa, se realizaron medidas de SERS con sustratos de Au(111) preparados en idénticas condiciones que aquellos empleados en la **Fig. 5.10a,b**. La **Fig. 5.10c** muestra que la intensidad de las bandas Raman es  $\sim 3$  veces mayor para el MB inmovilizado en la bicapa de DMPC respecto del MB sobre la SAM de DTT. Este resultado indica que se encuentran presentes una mayor cantidad de moléculas de MB inmovilizadas además de aquellas que fueron capaces de transferir carga en las medidas electroquímicas.

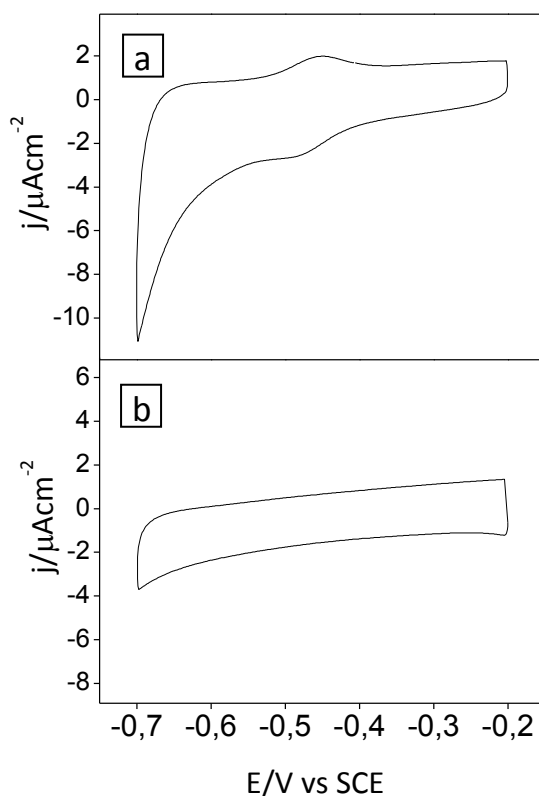
Hasta ahora asumimos que el MB transfiere carga a través de la bicapa debido a que la cupla redox tiene una apariencia distinta a la hallada para MB inmovilizado sobre la SAM de DTT. Sin embargo, la transferencia de carga podría llevarse a cabo además a través de zonas de discontinuidad debidas a la fusión incompleta de las vesículas o bien a los límites de grano (**Fig. 5.8a**). Para identificar globalmente estos posibles defectos se recurrió al dinucleótido de Flavina-Adenina (FAD), el cual es incapaz de difundir a través de bicapas lipídicas debido a la presencia de dos grupos fosfato con carga negativa a  $\text{pH} = 7,0$ .

La **Figura 5.11a** muestra el voltamperograma cíclico de la cupla redox de FAD detectada sobre un sustrato de Au(111) modificado con una SAM de DTT empleando el mismo procedimiento de inmovilización que para MB (30 min de inmersión en una solución acuosa de FAD  $100 \mu\text{M}$ ). Es evidente que el FAD es electroquímicamente activo sobre DTT, sin embargo, empleando este mismo procedimiento para inmovilizar FAD sobre la bicapa de DMPC, no fue posible detectar la cupla redox del FAD (**Fig. 5.11b**), ni aún aumentando el tiempo de inmersión ( $t_i^{\text{FAD}} \approx 5 \text{ h}$ ). El aspecto del voltamperograma es idéntico al de las bicapas de DMPC sin FAD inmovilizado, observándose solo corrientes capacitivas de la doble capa eléctrica.

Un aspecto que vale la pena destacar está relacionado con la capacidad de la doble capa de los sustratos de Au(111) modificados con DMPC-DTT. Si bien la bicapa lipídica constituye una barrera de permeabilidad, las bicapas soportadas sobre sustratos hidrofílicos conservan

una capa intermedia de hidratación de  $\sim 10 \text{ \AA}$ .<sup>[15]</sup> Por esta razón, el ancho de la doble capa para el sistema DMPC-DTT-Au es similar al hallado para las SAMs de DTT ( $\sim 14 \text{ \mu F cm}^{-2}$ ).

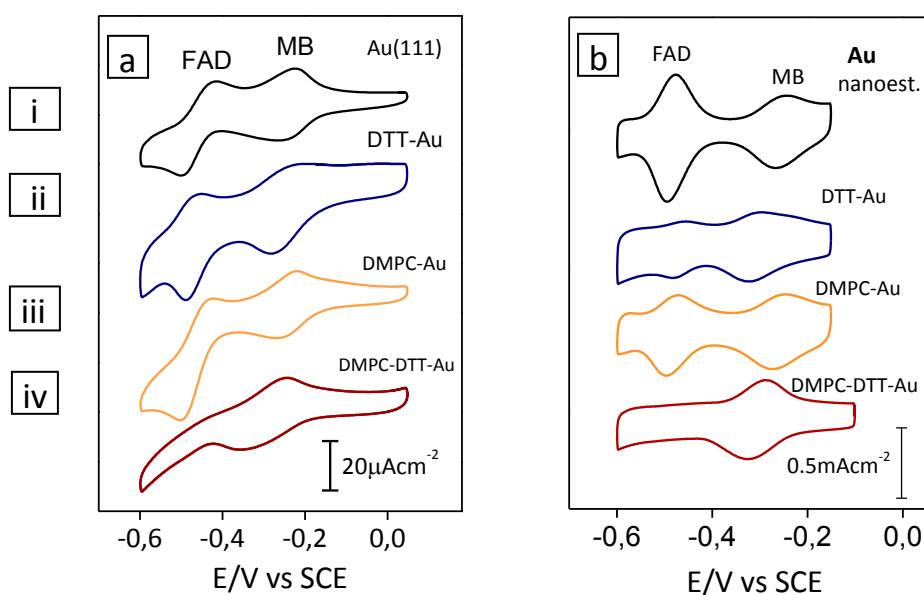
Si bien la detección de FAD en el sustrato modificado con la bicapa hubiera sido prueba suficiente para confirmar la presencia de discontinuidades, la afirmación inversa podría ser desacertada, ya que cargas menores a  $\approx 0,5 \text{ \mu C cm}^{-2}$ , el cual corresponde al límite de detección de la técnica, podrían pasar desapercibidas y éstas equivalen a un 4 % de cubrimiento de la superficie con una monocapa de FAD.



**Figura 5.11.** Voltamperogramas cíclicos de FAD inmovilizado sobre a) DTT y b) DMPC-DTT sobre Au(111) realizados en buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 a  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . La inmovilización de FAD se efectuó con  $t_i^{\text{FAD}} = 30 \text{ min}$  en solución  $100 \text{ \mu M}$  en ambos casos.

Desafortunadamente, tampoco es posible detectar el FAD mediante medidas de SERS sobre sustratos de Au(111) debido a que la señal Raman sobre esta superficie no es lo suficientemente intensa. Según se discutió en el Capítulo 4 (sección 4.3), la detección de FAD es posible sobre sustratos de oro nanoestructurados. De esta manera, el siguiente objetivo constituyó la formación de bicapas de DMPC sobre estos sustratos de alta área modificados con una SAM de DTT.

La **Figura 5.12** muestra la comparación del comportamiento de ambos sustratos (Au(111) y nanoestructurado) respecto de la formación de la bicapa de DMPC evaluada mediante el uso de ambas sondas (MB y FAD) en solución. De este modo, también podemos descartar que la ausencia de FAD en las bicapas sea debido a un rápida pérdida de las moléculas inmovilizadas debida al gradiente de concentración al enfrentar los sustratos al gran volumen de buffer fosfato de la celda electroquímica ( $\sim 50$  mL) libre de FAD. En primer lugar, se verificó la posibilidad de detectar ambas cuplas conjuntamente en 3 sistemas blanco tanto para los sustratos de Au(111) como para el oro nanoestructurado (**Fig. 5.12a,b i-iii**). Tanto el MB como el FAD fueron detectados sin dificultad sobre las superficies de oro sin modificar (**Fig. 5.12a,b i**), oro con una SAM de DTT (**Fig. 5.12a,b ii**) y oro sumergido 3 h en una suspensión de vesículas de DMPC a  $37^\circ\text{C}$  (**Fig. 5.12a,b iii**), empleando como electrolito buffer fosfato  $0,1\text{ M}$  con MB  $5 \times 10^{-6}\text{ M}$  + FAD  $10^{-5}\text{ M}$ .

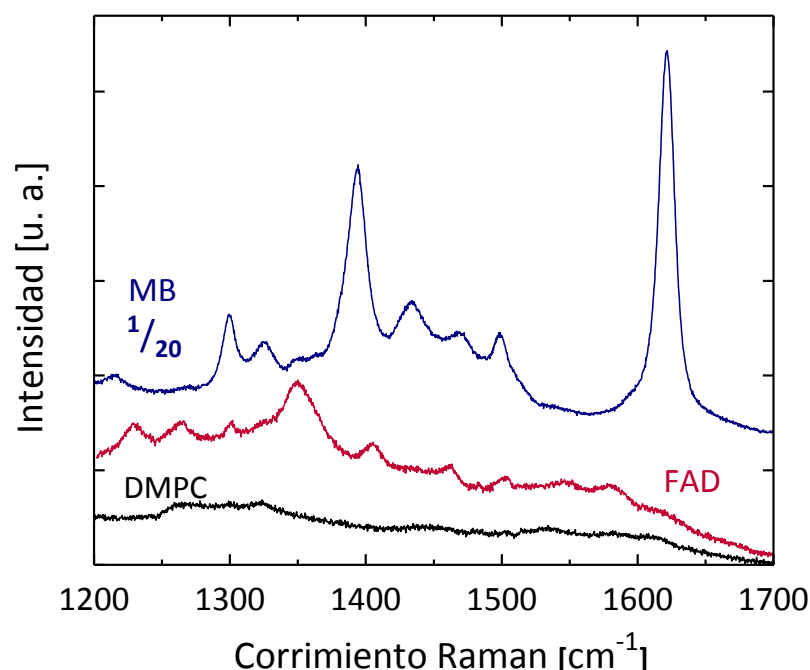


**Figura 5.12.** Voltamperogramas cíclicos medidos en una solución de MB  $5 \times 10^{-6}\text{ M}$  + FAD  $10^{-5}\text{ M}$  en buffer fosfato  $0,1\text{ M}$  a  $\text{pH} = 7,4$  a  $25^\circ\text{C}$  sobre a) Au(111) a  $v = 0,20\text{ Vs}^{-1}$  y b) oro nanoestructurado a  $v = 0,10\text{ Vs}^{-1}$ . i) Au sin modificar, ii) DTT-Au, iii) DMPC-Au y iv) DMPC-DTT-Au. Las densidades de corriente están referidas al área geométrica de los electrodos.

En concordancia con los resultados de las **Fig. 5.10b** y **Fig. 5.11b**, para el Au(111) fue posible detectar la cupla de MB mientras que la de FAD no fue perceptible (**Fig. 5.12a iv**). El sustrato de oro nanoestructurado, no sólo permite las medidas de FAD por SERS sino

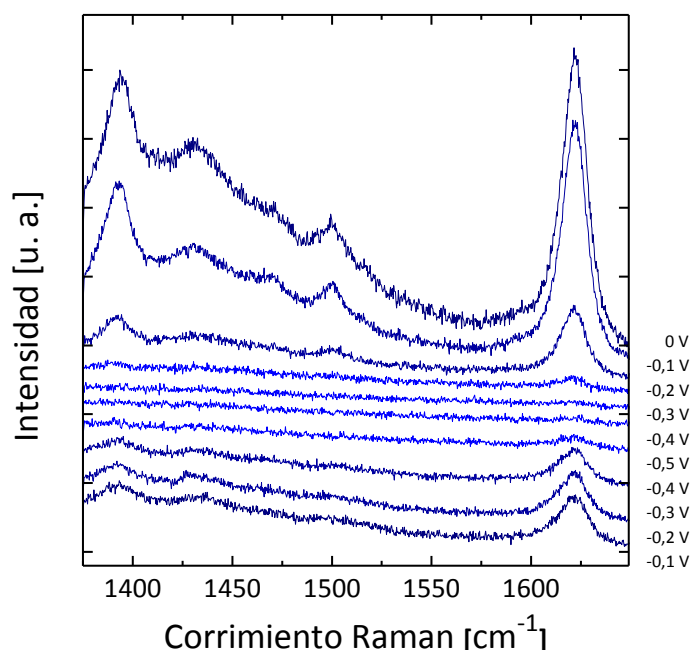
también aumenta la capacidad de detección electroquímica por su mayor área real. Sin embargo, tampoco en este caso, fue posible detectar la cupla redox del FAD mientras que sí la de MB (**Fig. 5.12b iv**).

Pasemos ahora a las medidas de SERS realizadas en sustratos de oro nanoestructurados modificados en idénticas condiciones que para la **Fig. 5.12b iv**, con el objetivo de obtener una bicapa de DMPC. La **Figura 5.13** muestra en negro el espectro SERS de la bicapa soportada sobre la SAM de DTT, la cual exhibe algunas bandas poco intensas relacionadas con los modos de vibración de las moléculas de fosfolípidos.<sup>[58]</sup> El espectro SERS del MB inmovilizado en la bicapa con  $t_i^{MB} = 30$  min en solución acuosa 100  $\mu$ M sobre este sustrato (**Fig. 5.13** en azul) presenta una intensidad muy superior, razón por la cual se dividió 20 veces para poder mostrarlo en el mismo gráfico. Siguiendo el mismo procedimiento de inmovilización para el FAD, fue posible detectar su espectro SERS (**Fig. 5.13** en rojo) con una intensidad comparable a la hallada para FAD inmovilizado en sustratos de oro nanoestructurado sin bicapa (**Fig. 4.9b**).



**Figura 5.13.** Espectros SERS ex situ correspondientes a sustratos de oro nanoestructurados modificados con una bicapa de DMPC sobre una SAM de DTT tomados con un laser de excitación de 647 nm, un tiempo de adquisición de 60 s y 70 mW de potencia. El espectro azul (20 veces más intenso que los otros) posee MB inmovilizado, el rojo es para FAD inmovilizado y el negro, para la bicapa de DMPC sola.

Para hallar la relación entre la cantidad de moléculas que transfieren carga y aquellas detectadas espectroscópicamente, se realizaron medidas de SERS in situ con control electroquímico. La **Figura 5.14** muestra los espectros SERS de MB obtenidos secuencialmente mediante la aplicación de potenciales escalonados. El procedimiento consistió en barrer a  $v = 0,01 \text{ Vs}^{-1}$  yendo de  $-0,1 \text{ V}$  a  $-0,5 \text{ V}$  y luego volviendo a  $-0,1 \text{ V}$ , deteniéndose cada  $0,1 \text{ V}$  durante  $1 \text{ s}$  a fin de adquirir el espectro asociado. El primer espectro corresponde a la molécula en su estado oxidado (**Fig. 5.14** primer espectro superior). A medida que se aplican potenciales más catódicos, el  $\text{MB}^+$  (oxidado) se reduce a MBH. El MBH es incoloro y no presenta bandas Raman con el laser de excitación empleado ( $568,1 \text{ nm}$ ), debido a la pérdida de su aromaticidad.<sup>[59]</sup> Si se invierte el sentido del barrido del potencial se recupera el espectro de la especie oxidada. Sin embargo, la intensidad de las señales es apenas la cuarta parte respecto del primer espectro registrado. Por lo tanto, tres cuartas partes de la cantidad de MB inmovilizada inicialmente se pierde en el primer ciclo.



**Figura 5.14.** Espectros SERS in situ de MB inmovilizado en una bicapa de DMPC soportada sobre una SAM de DTT sobre oro nanoestructurado medidos en buffer fosfato  $0,1 \text{ M}$  a  $\text{pH} = 7,4$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  en función del potencial aplicado durante un primer voltamperograma cíclico. Los espectros se tomaron con un laser de excitación de  $568,1 \text{ nm}$ , un tiempo de adquisición de  $1 \text{ s}$  y una potencia de  $70 \text{ mW}$ . Los potenciales (referidos al electrodo de  $\text{Ag/AgCl}$ ) se aplicaron durante la medida del espectro y se utilizó  $v = 0,01 \text{ Vs}^{-1}$  entre ellos.

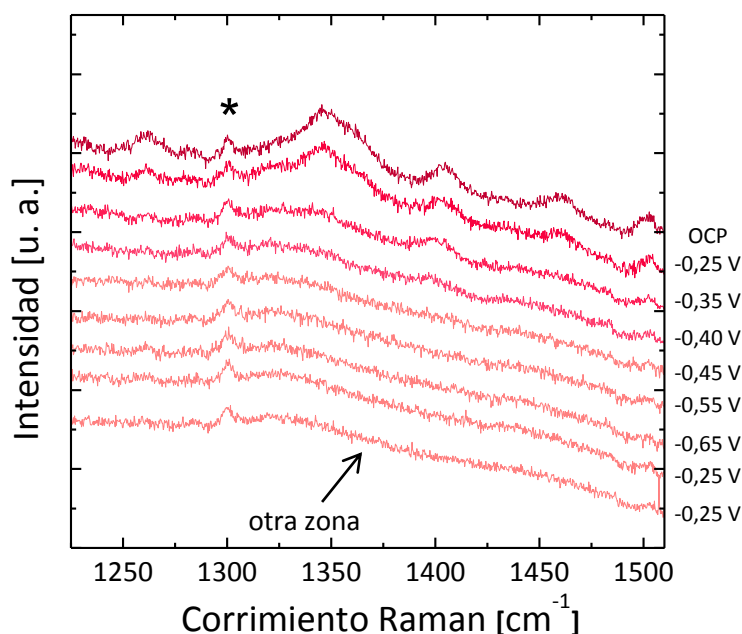
Si se continúa ciclando, la cantidad de material perdido es mucho menor (se conserva un 75 %) y prácticamente se mantiene en ciclos sucesivos, siendo posible oxidar y reducir la totalidad de estas moléculas. Este resultado se puede interpretar si se considera que inicialmente existen moléculas de MB inmovilizadas que no transfieren carga por encontrarse alejadas de la superficie del oro. Estas moléculas se encuentran como  $MB^+$  a OCP (potencial de circuito abierto), por lo tanto pueden detectarse en el primer espectro. Debido a que a -0,5 V el espectro corresponde únicamente a MBH, el  $MB^+$  alejado se pierde rápidamente antes que las moléculas capaces de transferir carga se reduzcan.

La pérdida de estas moléculas ocurre únicamente cuando se aplica el potencial ya que a OCP no se detectó una pérdida significativa durante la toma de espectros en distintas zonas del sustrato. Por lo tanto, la liberación está relacionada a un cambio en la bicapa debido al potencial aplicado. Mediante medidas de PM-IRRAS con control electroquímico, Horswell *et al.*<sup>[23]</sup> pudieron determinar que existen cambios en la orientación de las cadenas de DMPC en bicapas soportadas sobre oro, para el rango de potenciales que se empleó para el estudio de la cupla de MB. Esta reorientación del DMPC puede ser la causa de la liberación de las moléculas de MB más débilmente adsorbidas en la bicapa, mientras que para aquellas moléculas capaces de transferir carga, más cercanas al sustrato, estos cambios parecieran no ser suficientes para inducir su liberación.

Tratemos ahora el caso del FAD, el cual no había podido ser detectado por medidas electroquímicas mientras que sí se observó su espectro SERS para la especie oxidada. Tomando espectros a OCP (**Figura 5.15**, primer espectro superior) en distintas zonas de la muestra, se obtuvieron espectros de similar intensidad, indicando una distribución uniforme de moléculas en la superficie. A diferencia del MB, la especie reducida del FAD ( $FADH_2$ ) posee bandas Raman de similar<sup>[60]</sup> o mayor intensidad<sup>[61]</sup> que la especie oxidada para el mismo laser de excitación (647,1 nm), de manera que si las moléculas de FAD son capaces de transferir carga al sustrato de oro, podrían ser detectadas espectroscópicamente.

Aplicando potenciales escalonados tal como se procedió para el MB, yendo de -0,25 V a -0,65 V y retornando a -0,25 V, se puede observar que el espectro de FAD oxidado disminuye en intensidad, sin embargo no aparecen nuevos picos (**Fig. 5.15**). En el barrido inverso tampoco es posible recuperar el espectro de la especie oxidada. Para verificar que la

ausencia de los picos característicos no se deba a fenómenos de *photobleaching*<sup>1</sup>, se examinaron otras zonas del sustrato, las cuales exhibían el mismo espectro.

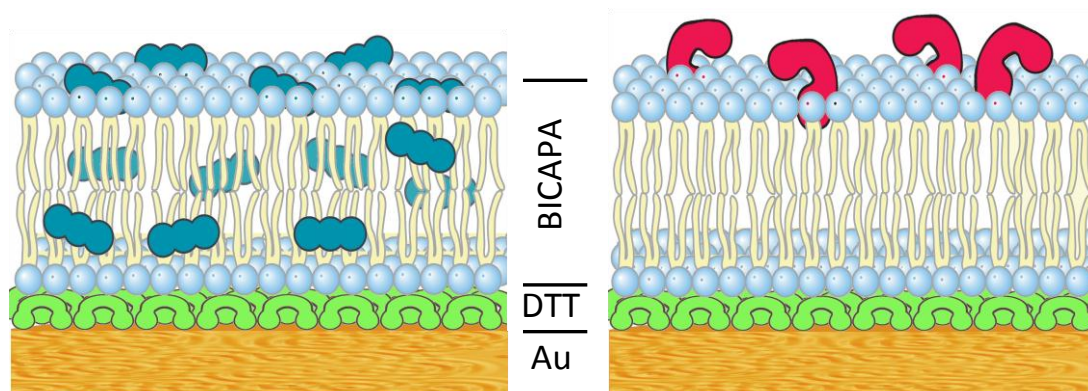


**Figura 5.15.** Espectros SERS in situ de FAD inmovilizado en una bicapa de DMPC soportada sobre una SAM de DTT sobre oro nanoestructurado medidos en buffer fosfato 0,1 M a pH = 7,4 a 20 °C en función del potencial aplicado durante un primer voltamperograma cíclico. Los espectros se tomaron con un laser de excitación de 647,1 nm, un tiempo de adquisición de 60s y una potencia de 70 mW. Los potenciales (referidos al electrodo de Ag/AgCl) se aplicaron durante la medida del espectro y utilizó  $v = 0,01 \text{ Vs}^{-1}$  entre ellos. El asterisco muestra una línea de plasma.

Por lo tanto podemos concluir que las moléculas de FAD débilmente adsorbidas, incapaces de transferir carga al sustrato porque se encuentran en la parte externa, se liberarían al aplicar un potencial debido a los cambios de orientación en las cadenas de DMPC como en el caso de las moléculas de  $\text{MB}^+$  débilmente inmovilizadas, razón por la cual es imposible recuperar el espectro de FAD oxidado al invertir el potencial de barrido. Sin embargo, al contrario de lo observado con el MB, la ausencia de señal electroquímica en estos sustratos de alta área implicaría que no existen moléculas capaces de atravesar la bicapa. De este modo, podríamos descartar la existencia de discontinuidades en la bicapa de DMPC que permitan el pasaje de moléculas como el FAD. Un esquema que permite explicar la situación de las moléculas de MB y FAD se muestra en la **Figura 5.16**.

<sup>1</sup> El fenómeno de *photobleaching* (fotoblanqueo) se refiere en este caso a la destrucción fotoquímica del FAD por irradiación con el laser de modo que pierda sus propiedades ópticas.



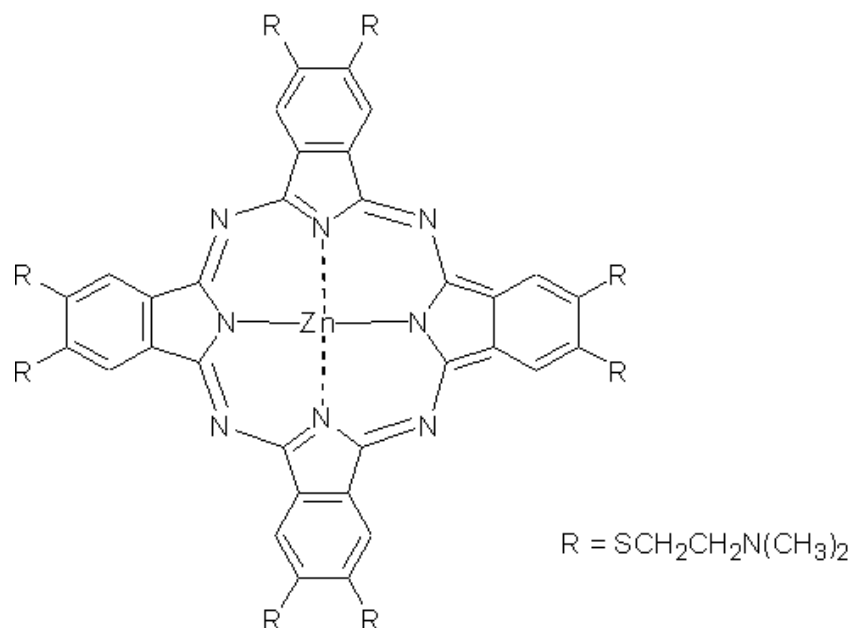


**Figura 5.16.** Esquema propuesto para la localización de MB (izq.) y FAD (der.) en el sistema DMPC-DDT-Au. Las moléculas en la cara exterior de la bicapa se liberan después de la aplicación de potencial.

## 5.5 Interacción con ftalocianina de Zn

Las ftalocianinas (**Figura 5.17**) tienen interesantes propiedades fotofísicas y fotoquímicas para su utilización en terapia fotodinámica (PDT, *photodynamic therapy*).<sup>[62]</sup> Sin embargo, estas moléculas son hidrofóbicas y su solubilidad en agua en condiciones fisiológicas constituye el principal inconveniente para su administración in vivo.<sup>[63]</sup> Actualmente se intenta encapsular las ftalocianinas en formulaciones liposomales debido a que estos sistemas han probado su efectividad para la administración de fármacos de carácter hidrofóbico en ensayos clínicos.<sup>[63]</sup> Uno de los objetivos es lograr su cuantificación una vez inmovilizadas en liposomas de modo de conocer con certeza la cantidad de ftalocianina que se suministrará al paciente.

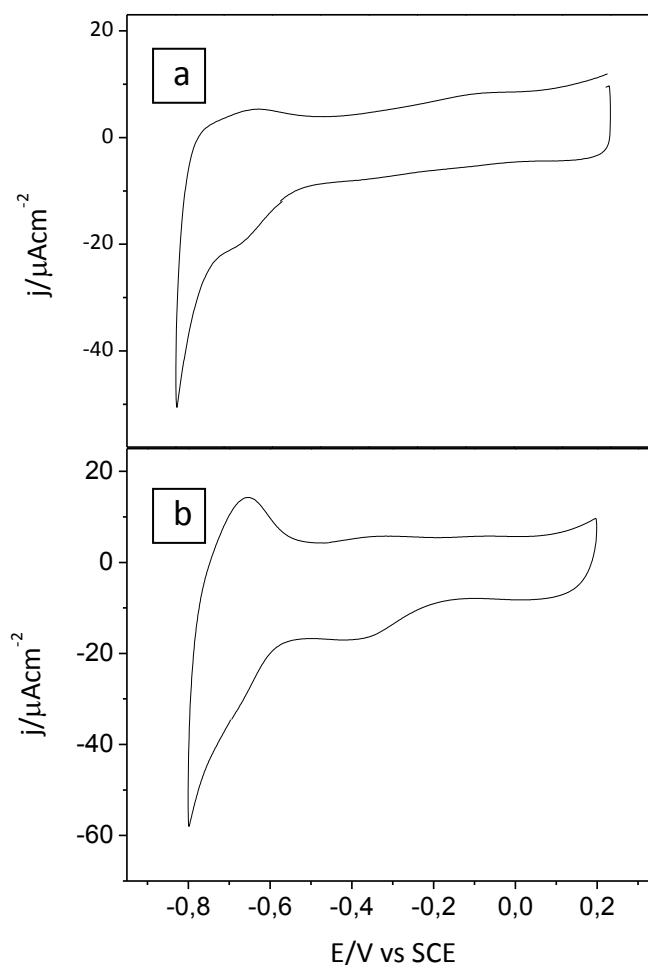
Siendo las ftalocianinas capaces de transferir electrones al oro,<sup>[64]</sup> se contempló la posibilidad de cuantificarlas por métodos electroquímicos una vez inmovilizadas en los liposomas. Para ello, se optó por el método de fusión de vesículas sobre las superficies de oro cubiertas por una SAM de DTT, tal como se discutió en las secciones anteriores. La ftalocianina (ZnPc) se incorporó durante la preparación de las vesículas de DMPC y debido a su virtual insolubilidad en agua, se localiza entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.<sup>[65, 66]</sup> A pesar que la fusión de vesículas implica la reorganización de la bicapa lipídica, se supondrá que la relación de ZnPc por unidad de área de bicapa en el liposoma será similar a la relación estimada en la bicapa soportada.



**Figura 5.17.** Estructura de 2,3,9,10,16,17,23,24-octakis[(N,N-dimetilamino) etilsulfanil]ftalocianinato de Zinc (II) (ZnPc).

Los procesos de oxidación y reducción en las ftalocianinas de Zn tienen lugar únicamente en el anillo central, ya que el centro metálico no ofrece electroactividad para los potenciales empleados en medidas de películas de ZnPc sobre sustratos de oro.<sup>[64]</sup> Para medidas en soluciones acuosas, está reportado que las ZnPc ponen en juego un solo electrón por molécula en cada onda voltamétrica.<sup>[64, 67]</sup>

En la **Figura 5.18** se muestran los voltamperogramas cíclicos medidos en buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4 para ZnPc adsorbida en la superficie de oro (por inmersión del sustrato durante 1 h en ZnPc  $10^{-7}$  M en THF) (**Fig. 5.18a**) e inmovilizada en la bicapa de DMPC (**Fig. 5.18b**). Se puede observar que en ambos casos, la respuesta voltamperométrica en el intervalo de potenciales seleccionado está pobremente definida y consta de al menos dos ondas de reducción y dos de oxidación asociadas a ZnPc. Si bien la segunda onda es más intensa, la cual podría emplearse para cuantificar ZnPc, se encuentra muy cerca de la HER y compromete la integridad de la bicapa. Por lo tanto, se optó por cambiar la solución electrolítica con el fin de obtener una cupla redox más definida.

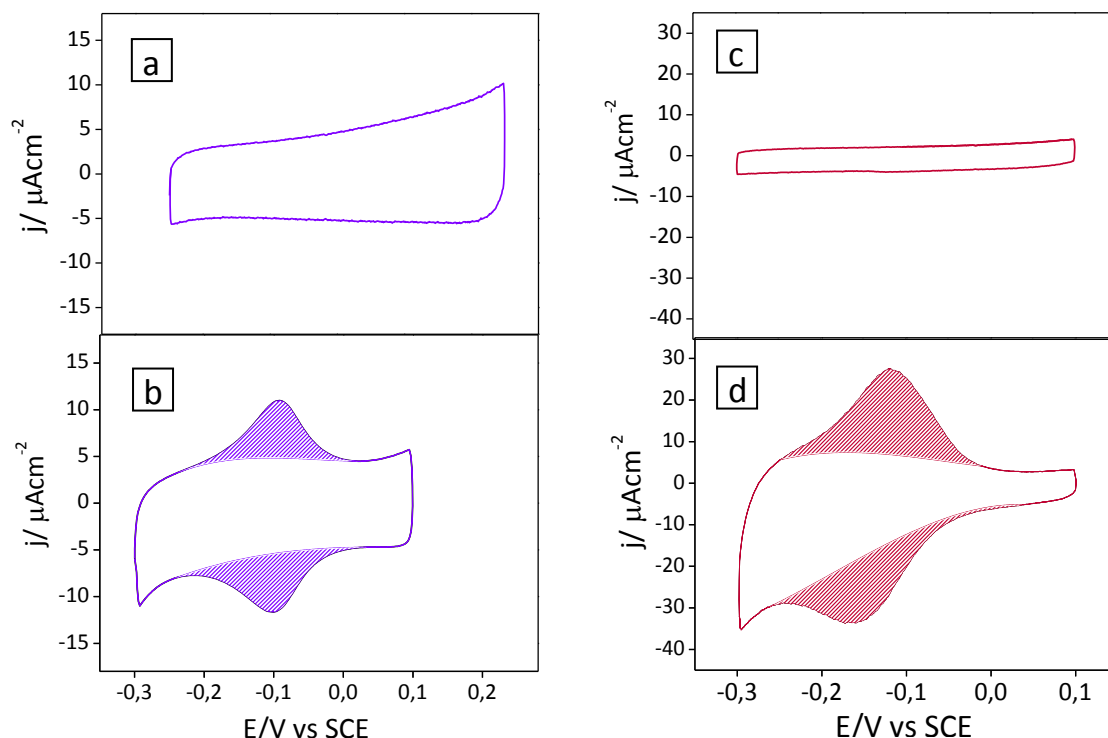


**Figura 5.18.** Voltamperogramas cíclicos de ZnPc sobre a) Au(111) y b) bicapa de DMPC sobre una SAM de DTT realizados en buffer fosfato 0,1 M pH 7,4 a  $v = 0,20 \text{ Vs}^{-1}$ .

Las medidas de voltamperometría cíclica en medio ácido para ZnPc adsorbida sobre oro muestran una única cupla bien definida,<sup>[67, 68]</sup> razón por la cual se eligió  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M para obtener resultados más satisfactorios. De hecho, ha sido previamente observado que una disminución en el pH del medio produce la protonación de los N periféricos, brindando cuplas más definidas al comparar los voltamperogramas registrados a  $\text{pH} \leq 2$  respecto a los obtenidos en medios neutros.<sup>[69, 70]</sup>

La **Figura 5.19a** muestra un voltamperograma cíclico de Au(111) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M, en el cual se puede apreciar la doble capa característica en este medio.<sup>[51]</sup> Después de la inmersión del mismo sustrato durante 1 h en una solución ZnPc  $10^{-7} \text{ M}$  en THF se obtiene un voltamperograma como el que se muestra en la **Fig. 5.19b**, en el cual se puede observar, en el rango de potenciales seleccionado, una única cupla redox reversible con  $E_p^{\frac{1}{2}} = -0,096 \text{ V}$ . Si

se integran los picos anódico y catódico se obtiene cargas de 2,8 y 3,2  $\mu\text{C cm}^{-2}$ , respectivamente.

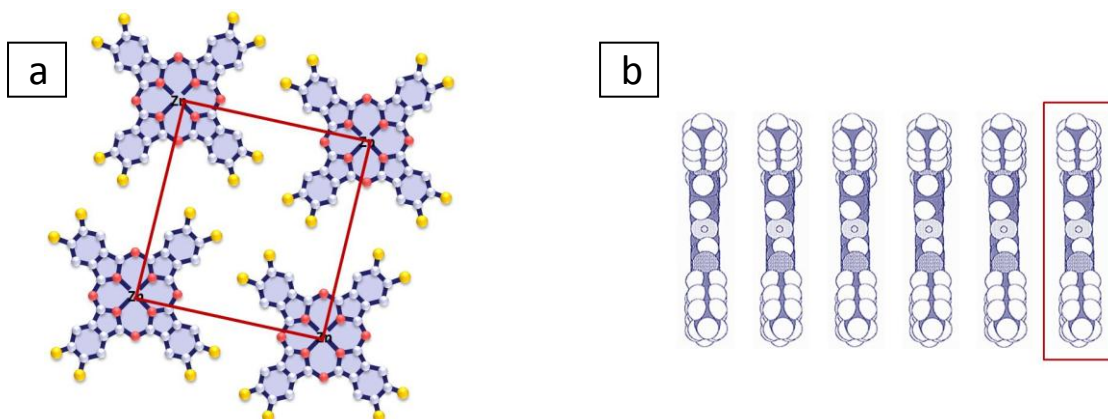


**Figura 5.19.** Voltamperogramas cíclicos efectuados en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M a  $v = 0,2 \text{ Vs}^{-1}$ . a) Au (111), b) Au(111) modificado con ZnPc, c) bicapa de DMPC sobre una SAM de DTT sobre Au(111) y d) bicapa de DMPC con ZnPc sobre una SAM de DTT sobre Au(111).

Para relacionar la carga obtenida con el cubrimiento de la superficie, supongamos que las ZnPc se autoensamblan en forma ordenada y compacta en una superficie de oro plana, con el anillo central paralelo a la superficie (**Figura 5.20a**). De este modo, las moléculas forman una celda unidad que puede ser determinada, por ejemplo, mediante medidas de STM, cuyos valores oscilan entre  $2,40 \text{ nm}^2$  <sup>[68]</sup> y  $6,76 \text{ nm}^2$  <sup>[71]</sup> de acuerdo al número, geometría y tamaño de las cadenas sustituyentes. Según estos valores de celda unidad, las cargas asociadas a una monocapa de ZnPc paralelas a la superficie corresponderían a  $6,7 \mu\text{C cm}^{-2}$  (para  $2,40 \text{ nm}^2$ ) y  $2,4 \mu\text{C cm}^{-2}$  (para  $6,76 \text{ nm}^2$ ).

Por otro lado, si se contempla un arreglo de moléculas perpendiculares a la superficie (**Figura 5.20b**), el área ocupada por molécula es mucho menor, con valores determinados por balanza de Langmuir-Blodgett que oscilan entre  $0,5 \text{ nm}^2$  y  $1,0 \text{ nm}^2$  <sup>[72]</sup> dependiendo

también de los sustituyentes laterales. Estos valores implican cargas de  $32,0 \mu\text{C cm}^{-2}$  (para  $0,5 \text{ nm}^2$ ) y  $16,0 \mu\text{C cm}^{-2}$  (para  $1,0 \text{ nm}^2$ ). De acuerdo a estas estimaciones, sobre la superficie de oro empleada, policristalina con terrazas orientadas (111), las moléculas se acomodarían preferentemente paralelas a la superficie, como ya ha sido reportado,<sup>[68]</sup> y los cubrimientos alcanzados con el procedimiento de inmovilización serían cercanos a la monocapa.

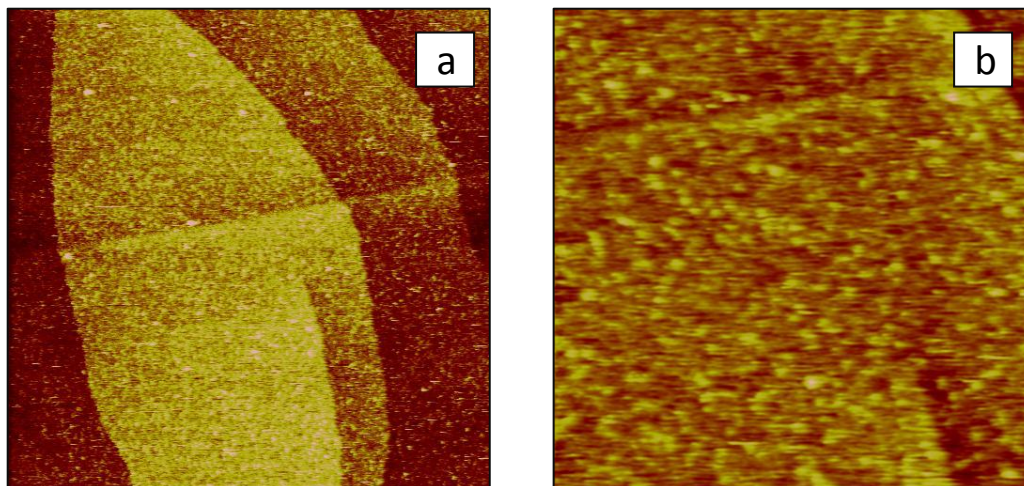


**Figura 5.20.** Esquema del arreglo de las ZnPc adsorbidas. a) Moléculas paralelas a la superficie (en rojo se marca la celda unidad) y b) moléculas perpendiculares a la superficie.

Las imágenes de STM de sustratos de oro con ZnPc adsorbida, preparados en idénticas condiciones que para la **Fig. 5.19b**, revelan una superficie uniformemente cubierta (**Figura 5.21a**). Para imágenes tomadas en campos más pequeños (**Fig. 5.21b**), no se llegó a definir una red ordenada, sin embargo si se tiene en cuenta que cada punto brillante de  $\sim 2,5 \text{ nm}$  de diámetro corresponde a una molécula de ZnPc, podemos confirmar un cubrimiento cercano a la monocapa.

Las medidas con la bicapa de DMPC soportada no presentaron procesos faradaicos en la ventana de potenciales seleccionada (**Fig. 5.19c**) y además no ofrecieron inconvenientes respecto a su estabilidad a pH ácido, manteniéndose el mismo voltamperograma con sucesivos ciclados. Para las bicapas formadas con vesículas que contenían ZnPc, el voltamperograma presentó una cupla redox (**Fig. 5.19d**) con  $E_p^{\frac{1}{2}} = -0,140 \text{ V}$ . Integrando los picos anódico y catódico, las cargas obtenidas son de  $8,4$  y  $10,8 \mu\text{Ccm}^{-2}$ . Estos valores son significativamente superiores a los hallados para ZnPc adsorbidos sobre oro. De acuerdo a los modelos planteados en la **Fig. 5.20**, en este caso las moléculas se deberían ubicar

orientadas perpendiculares a la superficie. A partir de los datos de carga, se tienen unas  $6 \times 10^{13}$  moléculas de ZnPc/cm<sup>2</sup>.

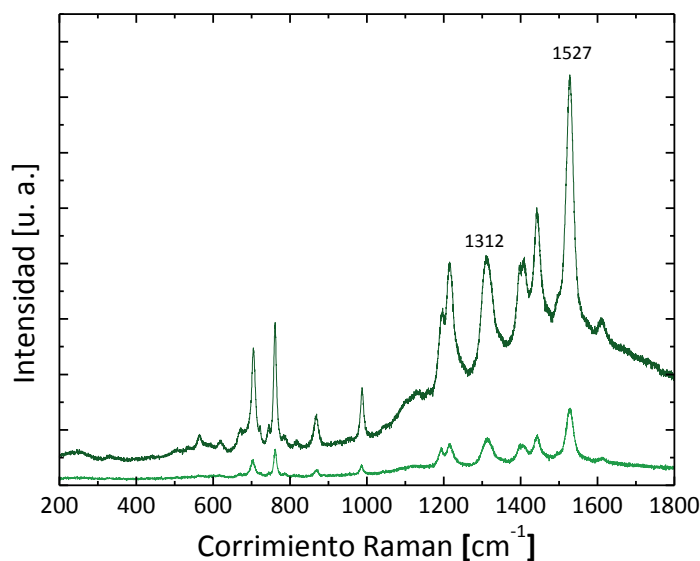


**Figura 5.21.** Imágenes de STM ex situ de un sustrato de Au(111) después de 1h de inmersión en una solución de ZnPc  $10^{-7}$  M en THF de a) 300 nm x 300 nm ( $Z = 0,8$  nm) y b) 100 nm x 100 nm ( $Z = 0,8$  nm).

El diámetro efectivo promedio, determinado a través de medidas de dispersión de luz estática (SLS, *static light scattering*), de las vesículas de DMPC conteniendo ZnPc fue de  $99,0 \pm 0,9$  nm.<sup>[50]</sup> Siendo el área superficial promedio de cada vesícula de  $3,1 \times 10^4$  nm<sup>2</sup>, habría  $1,85 \times 10^4$  moléculas de ZnPc por cada vesícula.

Finalmente se realizaron medidas de SERS para verificar si la relación hallada entre las cargas voltamétricas para ZnPc adsorbida sobre oro y la hallada en las bicapas se corresponde con la totalidad de las moléculas en la superficie. La ZnPc tiene una fuerte intensidad de bandas Raman sobre oro policristalino,<sup>[67]</sup> por lo tanto no fue necesario recurrir a medidas en sustratos de oro nanoestructurado.

La **Figura 5.22** muestra los espectros SERS ex situ para ZnPc adsorbida sobre oro (espectro inferior) y para ZnPc inmovilizada en la bicapa de DMPC (espectro superior), registrándose una mayor intensidad en este caso. Las bandas a  $1312$  y  $1527$  cm<sup>-1</sup> corresponden a modos de vibración de los anillos pirrol mientras que las bandas alrededor de  $1430$  cm<sup>-1</sup> se asignan a vibraciones C-N.<sup>[67]</sup>



**Figura 5.22.** Espectros SERS ex situ de ZnPc inmovilizado sobre Au(111) (inf.) y en una bicapa de DMPC soportada sobre una SAM de DTT (sup.) medidos con un laser de excitación de 647 nm, un tiempo de adquisición de 10 s y una potencia de 20 mW.

## 5.6 Conclusiones

Es posible formar bicapas de DMPC sobre sustratos de oro orientados (111), policristalinos y nanoestructurados. Las bicapas formadas conservan una fluidez lateral tal que permiten el pasaje de MB, el cual es capaz de transferir carga al sustrato de oro. Por otro lado, el número de discontinuidades es lo suficientemente bajo, ya que no fue posible detectar FAD electroquímicamente.

Mediante medidas de SERS in situ con control electroquímico, se determinó que además de las moléculas de MB capaces de oxidarse y reducirse existe otra cantidad que se libera rápidamente al aplicar el potencial. En el caso del FAD, también existían moléculas inmovilizadas que no eran capaces de transferir carga, que luego se liberaban al aplicar el potencial. Resultan interesantes las aplicaciones de este modelo de bicapa para estudios de liberación controlada de fármacos.

Por otro lado, se empleó el procedimiento de formación de bicapas para la cuantificación de una molécula (ZnPc) previamente encapsulada en las vesículas de DMPC, logrando estimar el número de moléculas presentes en cada vesícula.

## 5.7 Referencias

1. Gennis, R. B. (1989) *Biomembranes: Molecular Structure and Function*, Springer-Verlag, New York.
2. Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Matsudaira, P. (2007) *Molecular Cell Biology*, 6th ed., W. H. Freeman.
3. Tanford, C. (1980) *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2nd ed., Wiley.
4. Martin, D. K. (2007) The Significance of Biomimetic Membrane Nanobiotechnology to Biomedical Applications, in *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes* (Martin, D. K., Ed.), Springer, New York.
5. Chan, Y.-H. M.; Boxer, S. G. (2007) Model membrane systems and their applications, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 581-587.
6. Sessa, G.; Weissmann, G. (1968) Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes, *J. Lipid Res.* **9**, 310-318.
7. Lipowsky, R. (1998) Vesicles and Biomembranes, *Encycl. Appl. Phys.* **23**, 199-222.
8. Sackmann, E. (1996) Supported Membranes: Scientific and Practical Applications, *Science* **271**, 43-48.
9. Dufrêne, Y. F.; Lee, G. U. (2000) Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1509**, 14-41.
10. Kiessling, V.; Domanska, M. K.; Murray, D.; Wan, C.; Tamm, L. K. (2008) Supported Lipid Bilayers: Development and Applications in Chemical Biology, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology Vol. 4* (Begley, T. P., Ed.), John Wiley & Sons, Inc.
11. Tamm, L. K.; McConnell, H. M. (1985) Supported phospholipid bilayers, *Biophys. J.* **47**, 105-113.
12. Rädler, J.; Strey, H.; Sackmann, E. (1995) Phenomenology and Kinetics of Lipid Bilayer Spreading on Hydrophilic Surfaces, *Langmuir* **11**, 4539-4548.
13. Brian, A. A.; McConnell, H. M. (1984) Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 6159-6163.
14. Langmuir, I.; Schaefer, V. J. (1938) Activities of Urease and Pepsin Monolayers, *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 1351-1360.
15. Castellana, E. T.; Cremer, P. S. (2006) Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design, *Surf. Sci. Rep.* **61**, 429-444.
16. Tokumasu, F.; Jin, A. J.; Feigenson, G. W.; Dvorak, J. A. (2003) Nanoscopic Lipid Domain Dynamics Revealed by Atomic Force Microscopy, *Biophys. J.* **84**, 2609-2618.
17. Scomparin, C.; Lecuyer, S.; Ferreira, M.; Charitat, T.; Tinland, B. (2009) Diffusion in supported lipid bilayers: Influence of substrate and preparation technique on the internal dynamics, *Eur. Phys. J., E* **28**, 211-220-220-211-220-220.
18. Naumann, R.; Jonczyk, A.; Hampel, C.; Ringsdorf, H.; Knoll, W.; Bunjes, N.; Gräber, P. (1997) Coupling of proton translocation through ATPase incorporated into supported lipid bilayers to an electrochemical process, *Bioelectrochem. Bioenerget.* **42**, 241-247.
19. Cullison, J. K.; Hawkridge, F. M.; Nakashima, N.; Yoshikawa, S. (1994) A Study of Cytochrome c Oxidase in Lipid Bilayer Membranes on Electrode Surfaces, *Langmuir* **10**, 877-882.
20. Garcia-Araez, N.; Brosseau, C. L.; Rodriguez, P.; Lipkowski, J. (2006) Layer-by-Layer PMIRRAS Characterization of DMPC Bilayers Deposited on a Au(111) Electrode Surface†, *Langmuir* **22**, 10365-10371.
21. Cho, N.-J.; Kanazawa, K. K.; Glenn, J. S.; Frank, C. W. (2007) Employing Two Different Quartz Crystal Microbalance Models To Study Changes in Viscoelastic Behavior upon Transformation of Lipid Vesicles to a Bilayer on a Gold Surface, *Anal. Chem.* **79**, 7027-7035.



22. Keller, C. A.; Kasemo, B. (1998) Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance, *Biophys. J.* **75**, 1397-1402.
23. Horswell, S. L.; Zamylny, V.; Li, H.-Q.; Merrill, A. R.; Lipkowski, J. (2002) Electrochemical and PM-IRRAS studies of potential controlled transformations of phospholipid layers on Au(111) electrodes, *Faraday Discuss.* **121**, 405-422.
24. Zawisza, I.; Bin, X.; Lipkowski, J. (2004) Spectroelectrochemical studies of bilayers of phospholipids in gel and liquid state on Au(111) electrode surface, *Bioelectrochemistry* **63**, 137-147.
25. Cha, T.; Guo, A.; Zhu, X. Y. (2006) Formation of Supported Phospholipid Bilayers on Molecular Surfaces: Role of Surface Charge Density and Electrostatic Interaction, *Biophys. J.* **90**, 1270-1274.
26. Twardowski, M.; Nuzzo, R. G. (2003) Molecular Recognition at Model Organic Interfaces: Electrochemical Discrimination Using Self-Assembled Monolayers (SAMs) Modified via the Fusion of Phospholipid Vesicles, *Langmuir* **19**, 9781-9791.
27. Zhang, L.; Vidu, R.; Waring, A. J.; Lehrer, R. I.; Longo, M. L.; Stroeve, P. (2002) Electrochemical and Surface Properties of Solid-Supported, Mobile Phospholipid Bilayers on a Polyion/Alkylthiol Layer Pair Used for Detection of Antimicrobial Peptide Insertion, *Langmuir* **18**, 1318-1331.
28. Plant, A. L. (1993) Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold, *Langmuir* **9**, 2764-2767.
29. Lang, H.; Duschl, C.; Vogel, H. (1994) A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces, *Langmuir* **10**, 197-210.
30. Raguse, B.; Braach-Maksyvtis, V.; Cornell, B. A.; King, L. G.; Osman, P. D. J.; Pace, R. J.; Wieczorek, L. (1998) Tethered Lipid Bilayer Membranes: Formation and Ionic Reservoir Characterization, *Langmuir* **14**, 648-659.
31. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. (2001) *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
32. Weisshaar, D. E.; Walczak, M. M.; Porter, M. D. (1993) Electrochemically induced transformations of monolayers formed by self-assembly of mercaptoethanol at gold, *Langmuir* **9**, 323-329.
33. Zhang, J.; Bilić, A.; Reimers, J. R.; Hush, N. S.; Ulstrup, J. (2005) Coexistence of Multiple Conformations in Cysteamine Monolayers on Au(111), *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 15355-15367.
34. Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman and Company, New York.
35. New, R. R. C. (1990) Preparation of liposomes, in *Liposomes: a Practical Approach* (New, R. R. C., Ed.), IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
36. Akashi, K.; Miyata, H.; Itoh, H.; Kinoshita Jr, K. (1996) Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope, *Biophys. J.* **71**, 3242-3250.
37. Valenzuela, S. M. (2007) Liposome Techniques for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes, in *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes* (Martin, D. K., Ed.), Springer, New York.
38. Blumenthal, R.; Clague, M. J.; Durell, S. R.; Epand, R. M. (2003) Membrane Fusion, *Chem. Rev.* **103**, 53-70.
39. Seifert, U.; Lipowsky, R. (1990) Adhesion of vesicles, *Physical Review A* **42**, 4768-4768.
40. Reviakine, I.; Brisson, A. (2000) Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy, *Langmuir* **16**, 1806-1815.
41. Einstein, A. (1905) Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *Ann. Phys.* **322**, 549-560.
42. Keller, C. A.; Glasmästar, K.; Zhdanov, V. P.; Kasemo, B. (2000) Formation of Supported Membranes from Vesicles, *Phys. Rev. Lett.* **84**, 5443-5443.

43. Reimhult, E.; Höök, F.; Kasemo, B. (2003) Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure†, *Langmuir* 19, 1681-1691.
44. Johnson, J. M.; Ha, T.; Chu, S.; Boxer, S. G. (2002) Early Steps of Supported Bilayer Formation Probed by Single Vesicle Fluorescence Assays, *Biophys. J.* 83, 3371-3379.
45. Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. (2006) Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View, *Langmuir* 22, 3497-3505.
46. Cunin, F.; Milhiet, P.-E.; Anglin, E.; Sailor, M. J.; Espenel, C.; Le Grimellec, C.; Brunel, D.; Devoisselle, J.-M. (2007) Continuous planar phospholipid bilayer supported on porous silicon thin film reflector, *Ultramicroscopy* 107, 1048-1052.
47. Goksu, E. I.; Hoopes, M. I.; Nellis, B. A.; Xing, C.; Faller, R.; Frank, C. W.; Risbud, S. H.; Satcher Jr, J. H.; Longo, M. L. (2010) Silica xerogel/aerogel-supported lipid bilayers: Consequences of surface corrugation, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1798, 719-729.
48. Roiter, Y.; Ornatska, M.; Rammohan, A. R.; Balakrishnan, J.; Heine, D. R.; Minko, S. (2009) Interaction of Lipid Membrane with Nanostructured Surfaces, *Langmuir* 25, 6287-6299.
49. Salvarezza, R. C.; Arvia, A. J. (1996) A Modern Approach to Surface Roughness Applied to Electrochemical Systems, in *Modern Aspects of Electrochemistry* (Conway, B. E., Bockris, J. O. M., and White, R. E., Eds.), pp 289-373, Plenum Press, New York.
50. Diz, V. E.; Gauna, G. A.; Strassert, C. A.; Awruch, J.; Dicelio, L. E. (2010) Photophysical properties of microencapsulated phthalocyanines, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 14, 278-283.
51. Hamelin, A. (1996) Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 1. Behaviour at low-index faces, *J. Electroanal. Chem.* 407, 1-11.
52. Mao, G.; Liang, X.; Simon Ng, K. Y. (2004) Direct Force Measurement of Liposomes by Atomic Force Microscopy, in *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Marcel Dekker, Inc.
53. Tokumasu, F.; Jin, A. J.; Feigenson, G. W.; Dvorak, J. A. (2003) Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation, *Ultramicroscopy* 97, 217-227.
54. Garcia-Manyes, S.; Redondo-Morata, L.; Oncins, G.; Sanz, F. (2010) Nanomechanics of Lipid Bilayers: Heads or Tails?, *J. Am. Chem. Soc.* 132, 12874-12886.
55. Adamson, A. W.; Gast, A. P. (1997) *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th ed., John Wiley & Sons, New York.
56. Smith, B. A.; McConnell, H. M. (1978) Determination of molecular motion in membranes using periodic pattern photobleaching, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2759-2763.
57. Caetano, W.; Haddad, P. S.; Itri, R.; Severino, D.; Vieira, V. C.; Baptista, M. S.; Schröder, A. P.; Marques, C. M. (2007) Photo-Induced Destruction of Giant Vesicles in Methylene Blue Solutions, *Langmuir* 23, 1307-1314.
58. Lee, C.; Bain, C. D. (2005) Raman spectra of planar supported lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* 1711, 59-71.
59. Hutchinson, K.; Hester, R. E.; Alberly, W. J.; Hillman, A. R. (1984) Raman spectroscopic studies of a thionine-modified electrode, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1* 80, 2053-2053.
60. Xu, J.; Birke, R. L.; Lombardi, J. R. (1987) Surface-enhanced Raman spectroscopy from flavins adsorbed on a silver electrode: observation of the unstable semiquinone intermediate, *J. Am. Chem. Soc.* 109, 5645-5649.
61. Abdelsalam, M.; Bartlett, P. N.; Russell, A. E.; Baumberg, J. J.; Calvo, E. J.; Tognalli, N. s. G.; Fainstein, A. (2008) Quantitative Electrochemical SERS of Flavin at a Structured Silver Surface, *Langmuir* 24, 7018-7023.
62. Van Lier, J. E. (1990) Phthalocyanines as sensitizers for PDT of cancer, *Photodynamic Therapy of Neoplastic Disease* 1, 279-291.

63. Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. (2004) Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy, *J. Med. Chem.* **47**, 3897-3915.
64. Green, J. M.; Faulkner, L. R. (1983) Reversible oxidation and rereduction of entire thin films of transition-metal phthalocyanines, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 2950-2955.
65. Rodriguez, M. E.; Awruch, J.; Dicio, L. (2002) Photophysical properties of Zn(II) phthalocyanines incorporated into liposomes, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **6**, 122-129.
66. Nunes, S. M. T.; Sguilla, F. S.; Tedesco, A. C. (2004) Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**, 273-284.
67. Palys, B. J.; Puppels, G. J.; van den Ham, D.; Feil, D. (1992) Raman spectra of zinc phthalocyanine monolayers adsorbed on glassy carbon and gold electrodes by application of a confocal Raman microspectrometer, *J. Electroanal. Chem.* **326**, 105-112.
68. Yoshimoto, S.; Tsutsumi, E.; Suto, K.; Honda, Y.; Itaya, K. (2005) Molecular assemblies and redox reactions of zinc(II) tetraphenylporphyrin and zinc(II) phthalocyanine on Au(1 1 1) single crystal surface at electrochemical interface, *Chem. Phys.* **319**, 147-158.
69. Golovin, M. N.; Seymour, P.; Jayaraj, K.; Fu, Y. S.; Lever, A. B. P. (1990) Perchlorinated phthalocyanines: spectroscopic properties and surface electrochemistry, *Inorg. Chem.* **29**, 1719-1727.
70. Kubota, L. T.; Gushikem, Y.; Perez, J.; Tanaka, A. A. (1995) Electrochemical Properties of Iron Phthalocyanine Immobilized on Titanium(IV) Oxide Coated on Silica Gel Surface, *Langmuir* **11**, 1009-1013.
71. Yang, Z.-Y.; Gan, L.-H.; Lei, S.-B.; Wan, L.-J.; Wang, C.; Jiang, J.-Z. (2005) Self-Assembly of PcOC8 and Its Sandwich Lanthanide Complex Pr(PcOC8)<sub>2</sub> with Oligo(Phenylene-ethynylene) Molecules, *The Journal of Physical Chemistry B* **109**, 19859-19865.
72. Bourgoin, J.-P.; Doublet, F.; Palacin, S.; Vandevyver, M. (1996) High In-Plane Anisotropy in Phthalocyanine LB Films, *Langmuir* **12**, 6473-6479.

# Capítulo 6

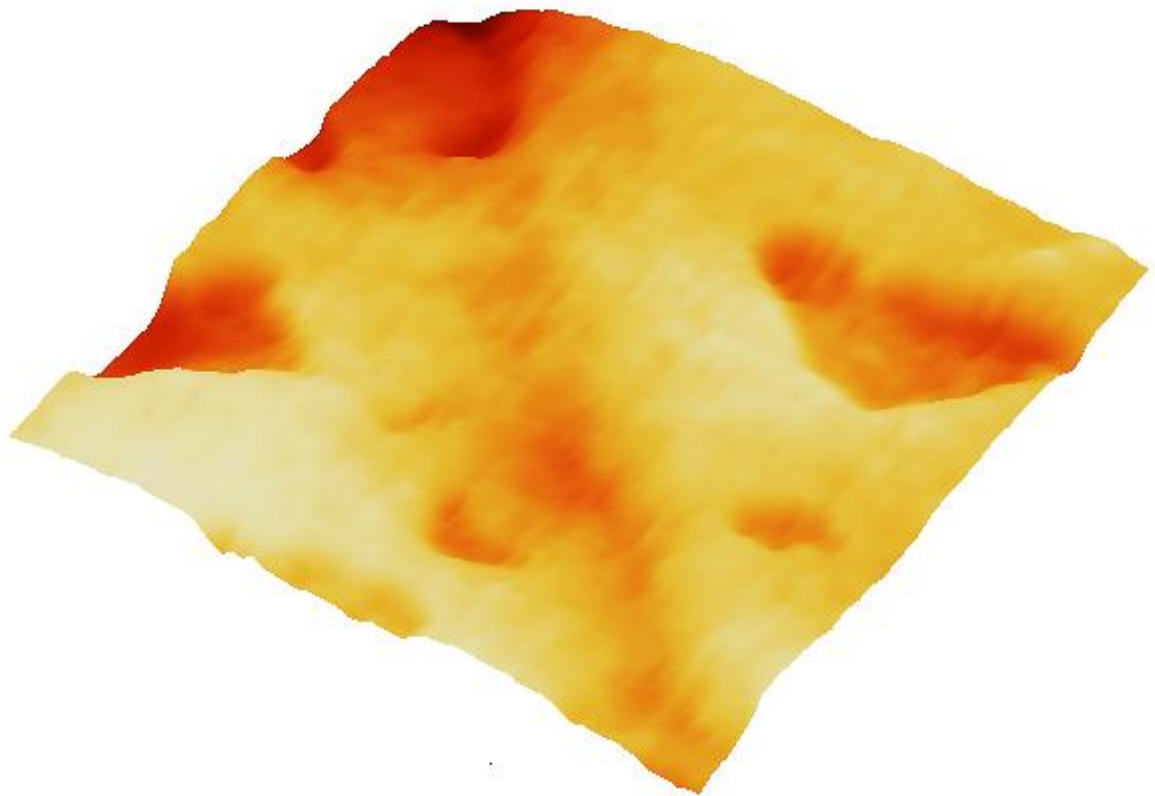
## Bicapas híbridas de fosfolípidos sobre monocapas autoensambladas de dodecanotiol

Se depositan películas de DMPC y DPPC de manera controlada sobre SAMs de dodecanotiol. Se estudian sus propiedades de permeabilidad en función de la fase en que se transfiere el fosfolípido.

*"You cannot be always torn in two. You will have to be one and whole."*

The Return of the King – J. R. R. Tolkien

("No puedes estar siempre dividido en dos. Tendrás que ser uno y entero.")



*"Stand by me"*

Ben E. King (1961)

## **6.1 Introducción**

Un aspecto relevante de la nanotecnología es la elaboración controlada de sistemas en la nanoescala controlando la organización de átomos y moléculas en arreglos bi- y tridimensionales. Como se mencionó con anterioridad, el control de sistemas biológicos de orden supramolecular, como las membranas celulares, constituye un excelente ejemplo de nanoestructuras inteligentes basadas en la autoorganización de macromoléculas biológicas. En este sentido, las membranas biomiméticas proveen la estructura de soporte básico para muchas aplicaciones en nanobiotecnología.<sup>[1]</sup>

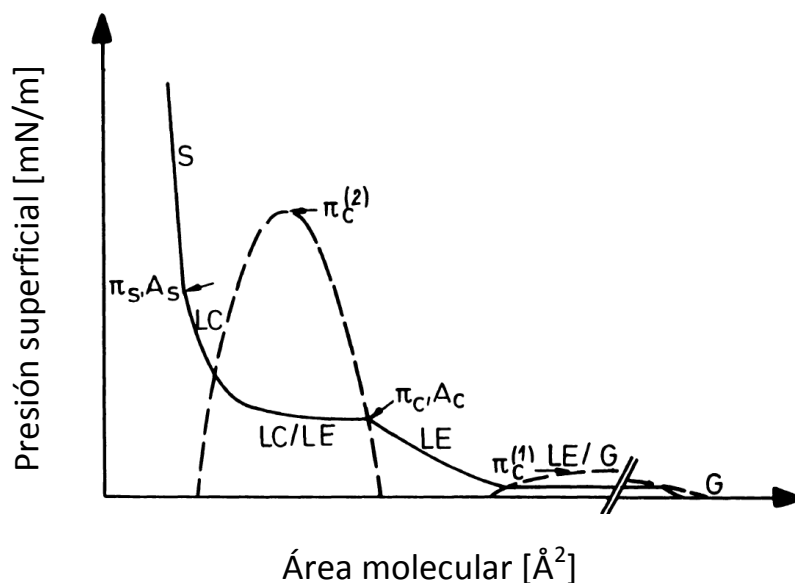
Las películas nanoestructuradas de materiales anfífilos han sido estudiadas extensivamente, principalmente debido a la posibilidad de controlar sus propiedades a nivel molecular.<sup>[2]</sup> Una de las técnicas empleadas para la fabricación de tales películas es la de Langmuir-Blodgett (LB),<sup>[3]</sup> que permite la deposición de películas de anfífilos capa por capa. El éxito de la técnica de LB depende de la obtención de películas de Langmuir estables sobre la subfase acuosa. Por lo tanto, la caracterización de las películas de Langmuir es de suma importancia. Cuando los parámetros están optimizados, esta técnica permite depositar sobre un sustrato sólido una monocapa homogénea con un preciso control del espesor y de la organización molecular.<sup>[2]</sup>

Si bien los sistemas de bicapas soportadas por fusión de vesículas ofrecen modelos sencillos de preparar, la organización de los fosfolípidos está sujeta a la temperatura de transición entre las fases “líquida” y “gel” y a la interacción directa con el sustrato. En este sentido, la técnica LB permite el control de la presión lateral, de modo de preparar bicapas con una organización molecular determinada.

### **6.1.1 Películas de Langmuir de fosfolípidos**

Las monocapas, considerándolas la mitad de una membrana, son un sistema plano bien definido para estudiar las interacciones entre fosfolípidos o bien entre fosfolípidos y proteínas.<sup>[4]</sup> Los fosfolípidos forman películas de Langmuir por autoorganización disolviendo sus grupos polares en la subfase acuosa mientras que sus cadenas hidrofóbicas quedan expuestas al aire (o a un solvente orgánico).<sup>[2]</sup>

La primera y más sencilla forma de caracterizar las monocapas de surfactantes es medir su presión lateral  $\pi$  en función del área ocupada por molécula,  $A$ , sobre una subfase acuosa a temperatura constante. Se pueden describir estas isothermas en función de los distintos estados de agregación o *fases*, que se presentan a medida que se comprime la monocapa (**Figura 6.1**).<sup>[4, 5]</sup>



**Figura 6.1.** Fases de una monocapa en una isoterma  $\pi$ - $A$ . Las líneas punteadas marcan las regiones de coexistencia de fases. También se indican las presiones correspondientes a los puntos críticos ( $\pi_c^{(1)}$  y  $\pi_c^{(2)}$ ). (Extraído de Ref. [4]).

A bajas densidades moleculares se encuentra primero una fase gaseosa (G). Esta fase no es completamente desordenada como en un sistema tridimensional, ya que las moléculas exhiben una orientación preferencialmente perpendicular relativa a la superficie.<sup>[4]</sup> Aumentando la densidad molecular, se ingresa a la fase líquido expandida (LE) para luego pasar a la fase más ordenada, líquido condensada (LC), atravesando una región de coexistencia de fases.

La transición de la fase G a LE está acompañada por una región de plateau constante que ocurre para presiones  $< 1$  mN/m (presión crítica,  $\pi_c^{(1)}$ ), debido a la debilidad de las interacciones que operan entre las cadenas hidrocarbonadas. Esta porción de la isoterma generalmente no puede ser resuelta con el método de la placa de Wilhelmy.<sup>[1]</sup>

En la fase LE, las moléculas se ordenan cualitativamente de la misma forma que en la fase gaseosa, pero su compresibilidad es considerablemente mayor que para una membrana lipídica. La fase LC se alcanza a través de un rango de coexistencia con la fase LE, por debajo de la temperatura crítica,  $T_c^{(2)}$ . La transición LC/LE se caracteriza por una segunda región de presión prácticamente constante en la isoterma en donde aparecen dominios de LC en la fase LE. Estos dominios se pueden observar directamente en la monocapa flotante mediante microscopía de ángulo de Brewster (BAM, *Brewster angle microscopy*)<sup>[6]</sup> o por microscopía de fluorescencia después de la incorporación de una sonda fluorescente pequeña en la película.<sup>[7, 8]</sup> La forma de los dominios depende de la estructura molecular y están determinados por la anisotropía de la tensión de línea y las repulsiones electrostáticas dipolo-dipolo.<sup>[9, 10]</sup> El número y tamaño de los dominios condensados aumenta durante la compresión de modo que al final de la región del plateau los dominios entran en contacto entre ellos.

En la fase condensada, la monocapa presenta una fuerte cohesión lateral. Las moléculas se encuentran empaquetadas compactamente y el área por molécula se aproxima a la sección transversal. La fase LC exhibe coeficientes de difusión mucho menores que la LE y una baja densidad de defectos de torsión. Las cadenas hidrocarbonadas están alineadas con un ángulo de inclinación menor a 30° y cada cadena posee 6 vecinos cercanos mientras que las proyecciones de las cadenas en la superficie forman una red oblicua o centrada rectangular.<sup>[4]</sup> Los diferentes estados en las monocapas condensadas están relacionados con diferentes arreglos de los grupos polares y de las cadenas hidrocarbonadas.<sup>[2]</sup>

Comprimiendo aún más la monocapa, se puede detectar una discontinuidad a la presión  $\pi_s$  para el área  $A_s$ . En este punto, la fase LC se transforma en una fase denominada sólida (S) sin cambios discontinuos en la densidad. La fase S se distingue de la LC por un alineamiento normal de las cadenas y por un rango de correlación posicional de largo alcance.<sup>[7]</sup>

Las regiones de la isoterma dependerán de la naturaleza del fosfolípido en estudio así como de la composición de la subfase empleada.<sup>[11]</sup> Para una mayor longitud de cadena hidrocarbonada, a una temperatura dada y para el mismo grupo polar, la presión correspondiente a la transición LE/LC disminuye. También ocurre una disminución en la presión si se reduce la repulsión entre grupos polares mediante el agregado de sales o iones



divalentes en la subfase. Además, si un fosfolípido posee un grupo cabeza voluminoso que impide la atracción entre cadenas, la presión de transición aumenta. La naturaleza cualitativa de las fases LE y LC, sin embargo, no cambia excepto cuando las fuerzas intermoleculares repulsivas sean tan grandes que no permitan la formación de la fase LC o bien cuando el grupo polar sea tan voluminoso que inhiba la formación de la fase S o la disminución del ángulo de inclinación durante la compresión.

La presencia de dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas crea desorden en la región hidrofóbica y, por lo tanto, dificulta la formación de la fase LC. Este efecto sería equivalente a un aumento en la temperatura o bien a una disminución de  $T_c^{(2)}$ . En muchos casos, elimina las fases ordenadas a menos que las cadenas sean considerablemente largas.

Una vez caracterizada la isoterma para un fosfolípido, o bien una mezcla de fosfolípidos, se puede estudiar los cambios introducidos por interacción con otras moléculas, produciendo fenómenos de expansión o compresión.<sup>[2]</sup> Estos sistemas se pueden preparar por co-dispersión del fosfolípido y la molécula de interés o bien por adsorción desde la subfase, donde se encuentra disuelta la molécula.

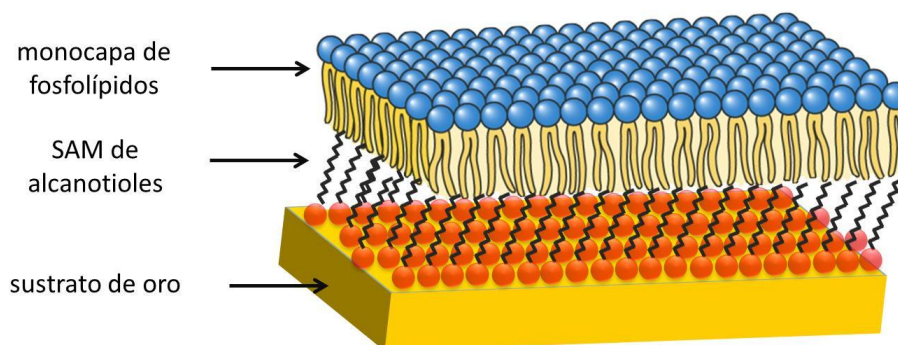
Para estudios mediante técnicas superficiales, las monocapas de fosfolípidos pueden transferirse a un sustrato sólido mediante las técnicas de deposición vertical de Langmuir-Blodgett (LB) o deposición horizontal de Langmuir-Schäfer (LS).

### **6.1.2 Bicapas híbridas alcanotiol/fosfolípido sobre oro**

La formación de bicapas híbridas como modelo de membranas lipídicas tiene como objetivo combinar la estabilidad y reproducibilidad para el cubrimiento de la superficie de las SAMs de alcanotioles con las características estructurales y de permeabilidad de las monocapas de fosfolípidos,<sup>[12, 13]</sup> manteniéndose unidas por la atracción cadena/cadena (**Figura 6.2**). La implementación del sustrato metálico permite además el empleo de métodos electroquímicos para caracterización. En este sentido, la elección del largo de cadena del alcanotiol responde a un compromiso entre la formación de monocapas con baja cantidad de defectos y un espesor que permita la transferencia de electrones.

Para la preparación de bicapas híbridas se han empleado distintos métodos de formación de monocapas de fosfolípidos sobre la superficie hidrofóbica provista por la SAM

de alcanotiol. La más ampliamente utilizada, debido a la sencillez de su fabricación, se basa en la ruptura y reorganización de vesículas inducida por la hidrofobicidad de la superficie.<sup>[12]</sup> Este método no tiene restricción respecto del tipo de vesículas a utilizar, siendo incluso posible el uso de membranas celulares.<sup>[14-16]</sup> A partir de experimentos de RAIRS y SERS,<sup>[17]</sup> acompañados por cálculos de dinámica molecular,<sup>[18]</sup> diversos autores han verificado el orden de las cadenas hidrocarbonadas, concluyendo que tanto la SAM como la monocapa de fosfolípidos sufrirían pocos cambios en el sistema de bicapa híbrida comparados con la SAM libre y las vesículas en solución, respectivamente. Sin embargo, a través de medidas de espectroscopía vibracional de suma de frecuencias (VSFS, *vibrational sum frequency spectroscopy*) para bicapas formadas sobre SAMs de octadecanotiol (ODT),<sup>[19]</sup> se determinaron corrimientos de hasta 10 °C para la temperatura de transición “gel” a “líquido”, demostrando la influencia del ODT en la monocapa de fosfolípido. Esta observación tiene importantes consecuencias respecto a la utilización de las bicapas híbridas como sistemas biomiméticos, ya que sus propiedades de fluidez se ven comprometidas.<sup>[20]</sup>



**Figura 6.2.** Esquema de una bicapa híbrida fosfolípido/alcanotiol sobre un sustrato de oro.

Por otro lado, la transferencia de monocapas de fosfolípidos sobre SAMs de alcanotiol mediante la técnica LB se ha empleado en menor medida, llevándose a cabo a partir de fases condensadas con presiones de 40<sup>[21, 22]</sup> y 45 mN/m.<sup>[23, 24]</sup> La deposición LB se ha realizado tradicionalmente a altas presiones ya que generalmente se asume que la eficiencia de la transferencia aumenta al asegurar una fuerte cohesión lateral en la monocapa.<sup>[1]</sup> En efecto, se ha podido observar mediante medidas de Reflectancia Total

Atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflectance*) y PM-IRRAS que las transferencias de una monocapa, tanto de ácidos grasos<sup>[25]</sup> como de fosfolípidos,<sup>[25, 26]</sup> sobre sustratos hidrofílicos a presiones menores a 40 mN/m traen aparejados cambios en el orden de las cadenas respecto de las medidas a la misma presión en la interfaz agua/aire. Sin embargo, este fenómeno podría no ocurrir durante la transferencia sobre SAMs de alcanotioles debido a la diferencia de las fuerzas puestas en juego. En las transferencias sobre sustratos hidrofílicos, la emersión de los sustratos posee fenómenos de drenaje de la subfase, no sólo como consecuencia de la gravedad sino también por la deshidratación de los grupos polares, y actúan interacciones atractivas fuertes que pueden ocasionar los cambios de empaquetamiento.<sup>[1]</sup> Contrariamente, la transferencia sobre una superficie hidrofóbica se realiza por inmersión (a favor de la gravedad) y operan fuerzas débiles entre las cadenas hidrofóbicas.

### **6.1.3 Objetivos del presente capítulo**

Preparar bicapas híbridas de fosfolípidos y SAMs de dodecanotiol sobre oro mediante la transferencia de una monocapa por la técnica de Langmuir-Blodgett a partir de distintas presiones superficiales. Estudiar mediante métodos electroquímicos y la técnica de Langmuir-Blodgett las propiedades de permeabilidad en cada fase (LE, LC/LE y LC) utilizando azul de metileno (MB) como sonda.

## **6.2 Experimental**

### **6.2.1 Sustratos de oro**

Se utilizaron películas delgadas de Au evaporado sobre vidrio borosilicato “Robax” provistas por la firma Arrandee® de Werther, Alemania. Estas placas de oro se sometieron a un tratamiento térmico con llama de gas butano o hidrógeno para obtener la orientación preferencial (111), como ya se describió en el Capítulo 3 (sección 3.2.1). A cada sustrato se le soldó un alambre de oro que sirvió tanto como contacto eléctrico para las medidas electroquímicas así como para su manipulación en la inmersión en la cuba de la balanza de Langmuir-Blodgett (LB) en el procedimiento de transferencia.

### **6.2.2 Reactivos**

Se emplearon los fosfolípidos dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) de Avanti Polar Lipids. El 1-dodecanotiol (DDT) 98% se compró marca Sigma. El cloruro de Azul de Metileno (MB) se compró marca Merck (grado Reag. Ph Eur) y las sales  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  99% y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  99% se compraron marca Sigma. El resto de los reactivos y solventes empleados fueron del mejor grado analítico disponible. Para las soluciones acuosas se empleó siempre agua MilliQ.

### **6.2.3 Preparación de SAMs de dodecanotiol**

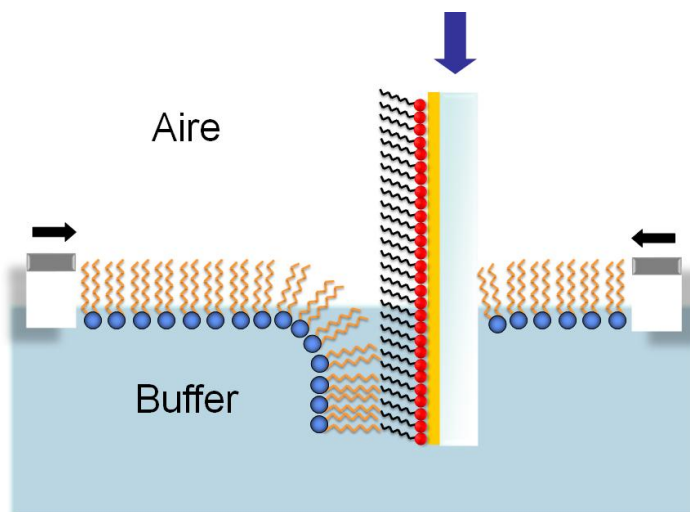
Las SAMs de DDT se formaron por inmersión de las placas de Au(111) en soluciones etanólicas 50  $\mu\text{M}$  durante 24 hs en ausencia de luz. Después de este periodo, se las enjuagó con abundante etanol absoluto. Los restos de solvente se removieron por secado en un flujo de  $\text{N}_2$ .

### **6.2.4 Preparación y transferencia de monocapas de fosfolípidos por Langmuir-Blodgett**

Las películas de Langmuir de fosfolípidos (DMPC y DPPC) se obtuvieron a partir de soluciones de 1 mg/mL del fosfolípido en una mezcla de cloroformo/metanol 3:1, en una cuba de LB de la marca KSV-NIMA (KSV minitrough y KSV 5000). Siempre se comenzó preparando una película en fase gaseosa, depositando la solución gota a gota sobre la subfase mediante una jeringa Hamilton, empleando finalmente unos 15  $\mu\text{L}$ . La superficie se dejó equilibrar al menos 15 min, de modo que se evaporara el solvente. Después del periodo de equilibración, la película fue comprimida a 5-10 mm/min hasta la presión deseada para la transferencia.

Una vez alcanzada la presión de transferencia, también se dejó equilibrar la película al menos 15 min, siguiendo el ajuste de las barreras con el tiempo hasta un valor constante. Las transferencias realizadas por inmersión consistieron en descender a 1 mm/min el sustrato de oro modificado con una SAM de DDT (**Figura 6.3**). Los sustratos se dejaron caer en recipientes individuales, dispuestos previamente a la preparación de la monocapa, de modo de retirarlos de la cuba sin abandonar la subfase.

La eficiencia de la transferencia se evaluó a partir del *transfer* y *transfer ratio* calculados por el programa provisto por KSV NIMA, los cuales se consideran óptimos para valores cercanos a la unidad. Los valores obtenidos en cada caso se tuvieron en cuenta al evaluar la respuesta electroquímica del MB.



**Figura 6.3.** Esquema de la transferencia de la monocapa de fosfolípido sobre la SAM de DDT.

La subfase consistió en buffer fosfato 0,1M a pH 7,4, preparada con agua MilliQ. La cuba de teflon y los recipientes se limpiaron cuidadosamente verificando obtener una presión superficial de 72,8 mN/m para el agua MilliQ. Antes de cada medida, la subfase se termostatóizó para la obtención de las isotermas a la temperatura deseada.

#### 6.2.5 Inmovilización de biomoléculas

Se prepararon soluciones acuosas 200  $\mu\text{M}$  de MB a partir de la droga pura en buffer fosfato 0,1M pH 7,4. La inmovilización del MB se llevó cabo mediante la adición de un volumen de la solución 200  $\mu\text{M}$  sobre el volumen de la solución donde se encontraban sumergidos los sustratos, de modo que la concentración final de MB fuera 100  $\mu\text{M}$ . Esta solución se dejó en contacto al menos 1 h, tiempo durante el cual se termostataron los sustratos. Luego se realizaron repetidos enjuagues con buffer fosfato hasta que la solución que contenía el sustrato quedara incolora.

### 6.2.6 Medidas electroquímicas

Las medidas de voltamperometría cíclica se realizaron con potenciostatos con capacidad de adquisición digital de datos. Se empleó una celda electroquímica de vidrio de tres electrodos conectada a un baño termostático. Como electrodos de referencia se utilizaron electrodos de calomel saturado (SCE) preparados en el laboratorio. El contraelectrodo fue una lámina de Pt de gran área y los electrodos de trabajo, los sustratos de oro modificados. Estos sustratos se transfirieron a la celda electroquímica sin abandonar nunca el medio acuoso. Como solución electrolítica se empleó buffer fosfato 0,1 M pH 7,4 desoxigenada mediante burbujeo de N<sub>2</sub> antes de medir.

Todas las medidas están expresadas en densidad de corriente ( $j$ ) respecto del área electroquímica del electrodo de oro, calculada a partir del pico de reducción del óxido de oro.<sup>[27]</sup> Los voltamperogramas cíclicos mostrados son representativos del comportamiento observado mientras que los datos de densidad de carga son resultado del promedio de al menos 5 medidas independientes.

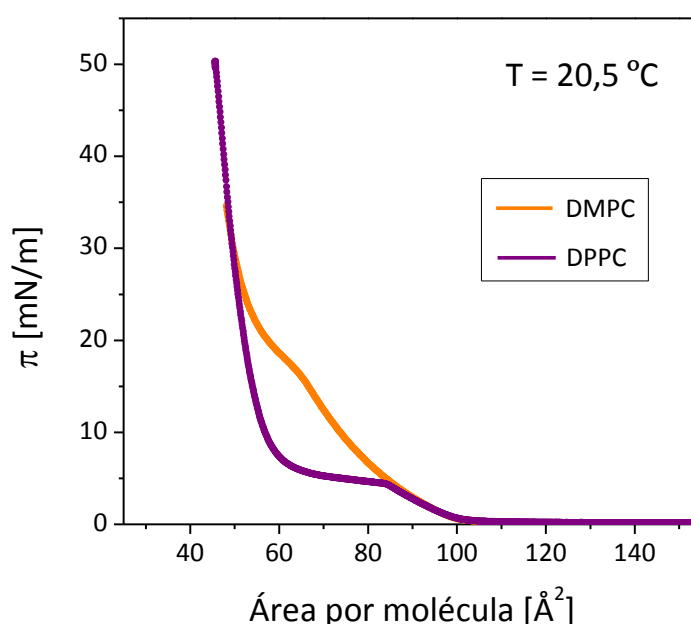
### 6.2.7 Medidas de AFM

Todas las medidas de AFM se llevaron a cabo a pH 7,4 en un microscopio Nanoscope V (Digital instruments, Inc.) dentro de una celda de fluidos (in situ), conteniendo buffer HEPES 10 mM + NaCl 0,9% en modo de contacto intermitente (*tapping mode*). Se emplearon puntas de Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (cantilevers triangulares con constante elástica 0,32 N/m, Veeco Probes). Las imágenes se analizaron usando el programa provisto por el fabricante.

## 6.3 Transferencia de monocapas de fosfolípidos sobre SAMs de dodecanotiol

El fosfolípido DMPC, empleado en la formación de vesículas del Capítulo 5, forma películas de Langmuir estables (**Figura 6.4**). Sin embargo, la isoterma crítica de DMPC se encuentra a 23 °C,<sup>[11]</sup> razón por la cual es necesario trabajar a temperaturas menores a 12,5 °C para obtener una clara distinción de las fases LE y LC.

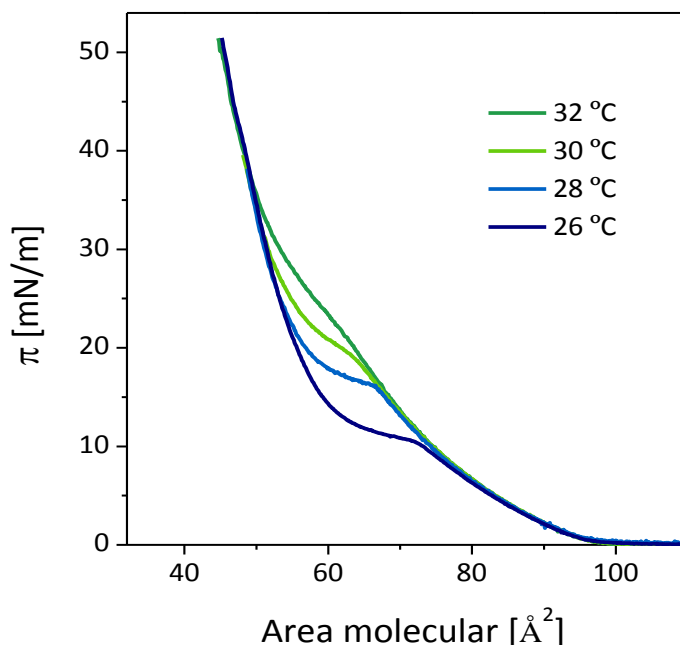
Bajando la temperatura, también descende la presión superficial  $\pi$ , lo cual implica el uso de muy bajas presiones ( $< 7$  mN/m), trayendo como consecuencia una baja eficiencia para la transferencia de películas en la fase LE. Por esta razón, se decidió emplear DPPC, apenas dos metilenos mayor en longitud de las cadenas respecto a DMPC, cuya isoterma crítica se encuentra a 43 °C.<sup>[11]</sup> A 20,5 °C, la isoterma de DPPC (**Fig. 6.4**) presenta un plateau de coexistencia de fases bien definido. No obstante, a esta temperatura la transición de fase se encuentra alrededor de los 5 mN/m, trayendo consigo la complicación del uso de bajas presiones para la transferencia de la fase LE.



**Figura 6.4.** Isotermas  $\pi$ -A para DMPC y DPPC a 20,5 °C en una subfase de buffer fosfato 0,1M pH 7,4.

Siguiendo el cambio de las isotermas de DPPC con la temperatura (**Figura 6.5**), se decidió trabajar a alrededor de 28 °C, ya que la isoterma presenta regiones bien definidas a presiones lo suficientemente altas para facilitar una correcta transferencia de las películas. A partir de la isoterma a 28 °C, se seleccionaron 3 presiones superficiales para realizar las transferencias sobre las SAMs de DDT: 10 mN/m (fase LE), 16 mN/m (zona de coexistencia LC/LE) y 30 mN/m (fase LC). En general, para los procedimientos de transferencia se contó con curvas de *transfer* continuas y un *transfer ratio* constante (**Fig. 2.38**), alcanzando valores de *transfer* de 0,8. Si bien este valor está algo alejado de la unidad, el hecho de que se

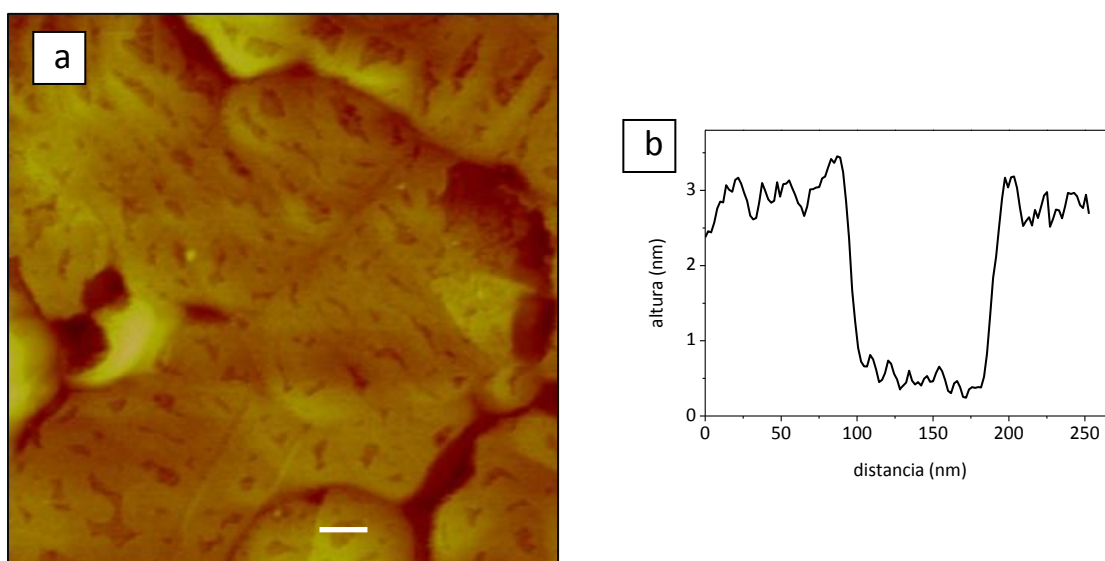
obtuviera repetitivamente para todas las presiones puede ser considerado como óptimo para el sistema.<sup>[2]</sup>



**Figura 6.5.** Isotermas  $\pi$ -A para DPPC a distintas temperaturas en una subfase de buffer fosfato 0,1M pH 7,4.

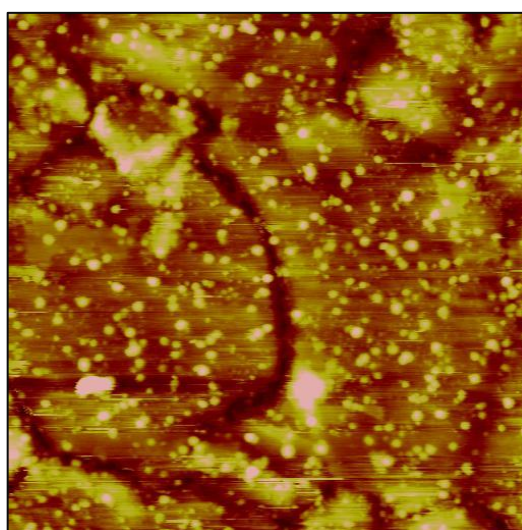
Para verificar el éxito de las transferencias, se intentó caracterizar por AFM las bicapas híbridas formadas. Para ello, se realizó en primer lugar la transferencia de una monocapa de DMPC con una  $\pi$  de 35 mN/m a 10,5 °C sobre una SAM de DDT. En la **Figura 6.6** se muestra una imagen tomada en modo de contacto intermitente a 20 °C. Se puede apreciar un cubrimiento total de la superficie con la presencia de múltiples grietas uniformemente distribuidas, cuya profundidad promedio es de ~2,5 nm. De acuerdo con los valores de altura de ~ 5 nm obtenidos para las bicapas de DMPC (Capítulo 5), estas grietas corresponderían a zonas de vacancias de fosfolípidos en una monocapa. Teniendo en cuenta que es necesario retirar los sustratos del medio acuoso para introducir las muestras en el microscopio, se atribuyó la formación de estas grietas al colapso parcial de la bicapa debido a la breve exposición al aire.





**Figura 6.6.** a) Imagen de AFM in situ en modo de contacto intermitente de  $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$  de la bicapa híbrida de DMPC formada sobre la SAM de DDT sobre Au orientado (111).  
b) Perfil de la sección transversal correspondiente a la línea blanca en a).

Si se realiza un secado adicional con una corriente suave de  $\text{N}_2$ , el colapso es completo (**Figura 6.7**), pudiéndose observar micelas y/o vesículas en la superficie donde antes se encontraba la monocapa de DMPC. Debido a la fragilidad que exhiben estas bicapas, se tuvo la precaución de nunca retirarlas del medio acuoso al realizar las medidas electroquímicas.

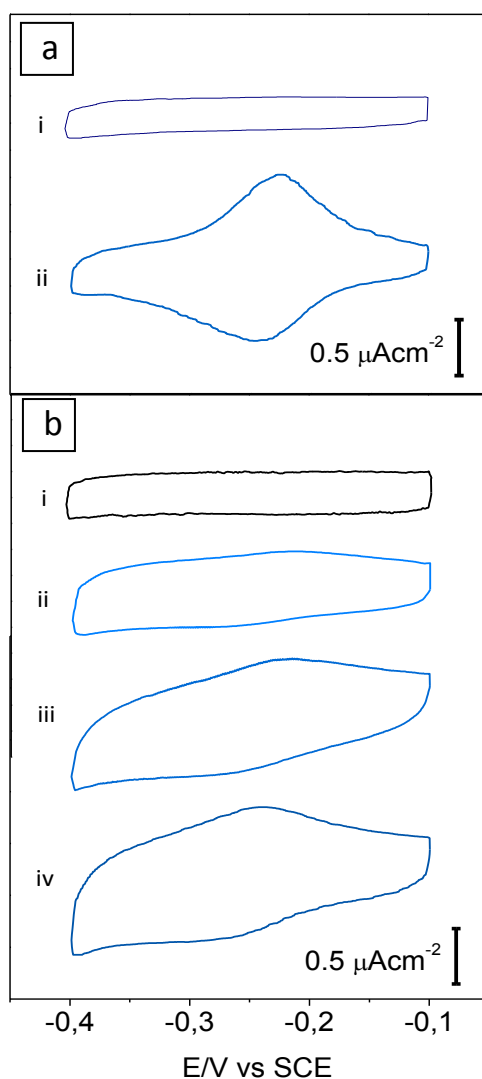


**Figura 6.7.** Imagen de AFM in situ en modo de contacto intermitente de  $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$  de la monocapa de DMPC colapsada sobre la SAM de DDT sobre Au orientado (111).

## 6.4 Interacción con MB

Con el fin de caracterizar la formación de las bicapas así como las propiedades de permeabilidad de cada fase, se empleó como sonda el MB, debido a la posibilidad de detectarlo sobre SAMs de DDT (Capítulo 4) y a su capacidad de atravesar bicapas lipídicas (Capítulo 5).

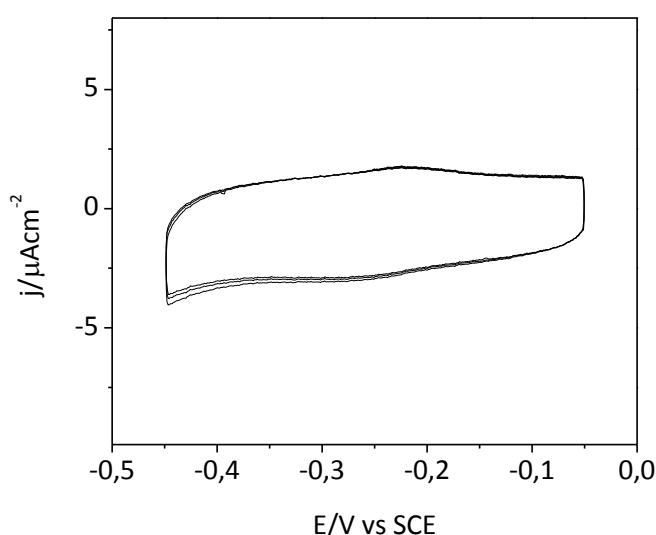
En la **Figura 6.8** se pueden observar los voltamperogramas cíclicos obtenidos siguiendo la interacción del MB con los distintos sistemas. En primer lugar, se realizaron voltamperogramas de DDT como blanco del experimento (**Fig. 6.8a**), logrando la inmovilización de MB, que exhibe una cupla reversible con  $E_p^{1/2} = -0,232$  V.



**Figura 6.8.** Voltamperogramas cíclicos de a) SAM de DDT y b) bicapa híbrida de DPPC-DDT (ii: fase LC, iii: zona de transición LE/LC y iv: fase LE) realizados en buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4 con  $v = 0,1 \text{ Vs}^{-1}$  a  $28^\circ\text{C}$ . Para i) 1h de inmersión en buffer sin MB y ii-iv) con 1h de inmersión en solución  $100 \mu\text{M}$  de MB.

Para las bicapas híbridas (**Fig. 6.8b**), la presencia de la monocapa de DPPC es una barrera adicional para la transferencia de carga del MB, ya que la cupla redox se detecta con mayor dificultad respecto de las SAMs de DDT sin bicapa. Para las monocapas transferidas desde la fase LE, la cupla se detecta con un  $E_p^{1/2} = -0,252$  V mientras que para la fase LC la cupla es apenas perceptible. En la zona de transición LE/LC, se obtuvo una respuesta intermedia, con una cupla menos reversible respecto a la fase LE.

Para bicapas preparadas con DMPC a partir de la fase LC (35 mN/m a 10,5 °C) sobre SAMs de DDT, se obtuvo un comportamiento similar al mostrado para DPPC en la **Fig. 6.8b i**. En la **Figura 6.9** se puede observar el voltamperograma obtenido luego de la inmersión de la bicapa híbrida durante 1h en solución de MB 100  $\mu$ M, donde la cupla de MB es apenas detectable.



**Figura 6.9.** Voltamperogramas cíclicos de la bicapa híbrida de DMPC-DDT formada a partir de la fase LC realizado en buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4 con  $v = 0,1$  Vs<sup>-1</sup> a 20 °C con 1h de inmersión en solución 100  $\mu$ M de MB.

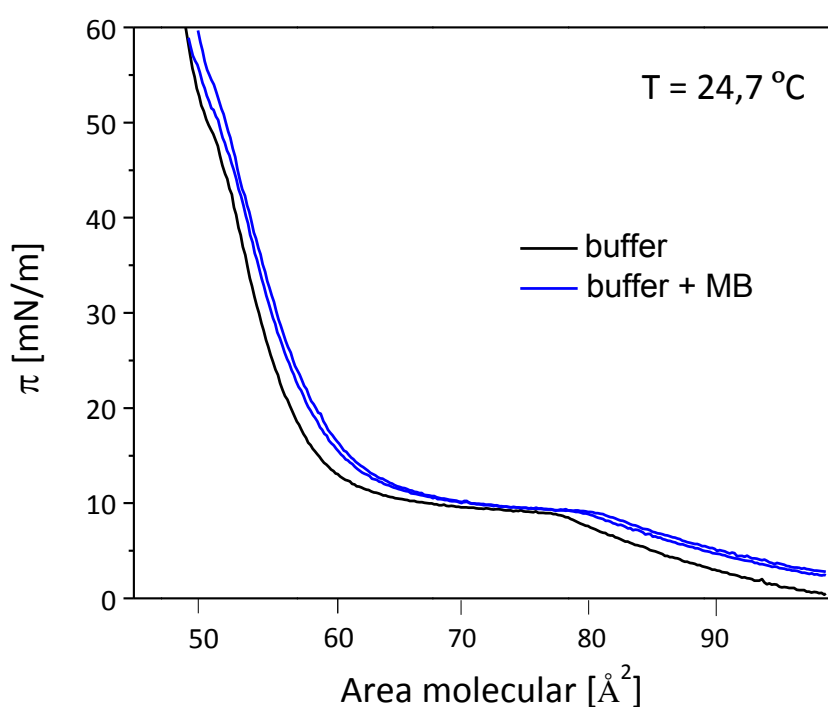
Cabe destacar que en los casos donde la transferencia no fue exitosa ya sea por obtener un *transfer* < 0,5, un *transfer ratio* oscilante o bien por fabricación con velocidades altas de deposición (> 10 mm/min), fue posible detectar la cupla de MB de manera similar a los voltamperogramas registrados para las SAMs de DDT (**Fig. 6.8a ii**).

De acuerdo con estudios relacionados a la interacción droga-biomembrana, específicamente entre fosfolípidos y compuestos del tipo fenotiazina (ver sección 4.1.2) como el MB, se ha observado que muchos efectos debidos a la presencia de los derivados de

fenotiazinas en membranas biológicas o modelo de membranas están relacionados con interacciones específicas con fosfolípidos aniónicos.<sup>[28]</sup> En soluciones acuosas el MB se encuentra como catión, razón por la cual presenta una gran afinidad por grupos con carga negativa. Entonces, fosfolípidos como DMPA (ácido dimiristoilfosfatídico),<sup>[29]</sup> DPPS (dipalmitoilfosfatidilserina),<sup>[30]</sup> DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol)<sup>[31]</sup> o CLP (cardiolipina)<sup>[32]</sup> con carga negativa neta a pH fisiológico pueden interaccionar electrostáticamente con el MB.

Como se comentó antes, la balanza de Langmuir-Blodgett permite el estudio de la interacción entre monocapas y moléculas solubles en agua. De este modo, *Prieto et al.*<sup>[29]</sup> observaron que el área ocupada por molécula de DMPA aumentaba marcadamente con la incorporación de MB. A pesar de que este efecto se debía principalmente a la interacción electrostática, el carácter parcialmente hidrofóbico del MB asiste en su retención en la monocapa de DMPA. De hecho, tanto MB<sup>+</sup> como su forma reducida MBH en solución acuosa forman espontáneamente monocapas mixtas con surfactantes neutros sobre superficies de Hg.<sup>[33]</sup>

De acuerdo con las observaciones mencionadas, se estudió la interacción de MB con la monocapa flotante de DPPC, mediante la adición de MB en la subfase acuosa (**Figura 6.10**). Las isothermas muestran que la interacción del MB es débil, ya que no se observa un desplazamiento abrupto como los reportados para DMPA<sup>[29]</sup> y DPPG.<sup>[31]</sup>



**Figura 6.10.** Isothermas  $\pi$ -A de DPPC a 24,7 °C con agregado de MB en la subfase.

A pesar de esta débil interacción, es evidente que el MB y otros derivados de fenotiazinas son capaces de interactuar tanto con los modelos de membranas con fosfolípidos neutros como con membranas biológicas. En este sentido, *Frenzel et al.*<sup>[34]</sup> estudiaron la interacción de la Clorpromazina (CPZ), un derivado de fenotiazina, con DMPC mediante RMN y calorimetría. A partir de estas medidas, infirieron que la droga CPZ penetra en la zona hidrofóbica, aumentando la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas aún en bajas cantidades (1 mol%, 1 CPZ cada 100 DMPC). Además, también ha sido reportado que la CPZ causa un desorden parcial en los fosfolípidos de las membranas de eritrocitos.<sup>[35]</sup> También mediante estudios de microcalorimetría y <sup>13</sup>C-RMN, se demostró que CPZ interactúa débilmente con sistemas modelo de DPPC y que la interacción droga-bicapa lipídica aumentaba dramáticamente cuando se agrega fosfatidilserina de cerebro bovino en las membranas.<sup>[36]</sup> También para este sistema se empleó la técnica de las monocapas de Langmuir demostrando que el área por molécula aumentaba significativamente después de la adición de CPZ para fosfolípidos ácidos (DPPS) mientras que para fosfolípidos neutros permanecía constante aún en presencia de la droga.<sup>[30]</sup>

Por lo tanto, la incorporación de MB en la SAM de DDT y en las bicapas DPPC-DDT, a pesar de la debilidad de la interacción, puede atribuirse a un fenómeno de acumulación en la interfaz favorecido por el potencial electroquímico, dado que inicialmente los sistemas se encuentran libres de MB. Pensando en un sistema droga-membrana, este efecto no debería ser desestimado ya que la ausencia inicial de la droga en la célula genera un gradiente que favorece su incorporación. En este sentido, los modelos de bicapa presentados constituyen un sistema sencillo para evaluar la interacción de distintas drogas, aún cuando mediante la técnica de Langmuir la interacción involucrada sea débil.

## **6.5 Conclusiones**

Fue posible preparar bicapas híbridas por el método LB a partir de distintas fases para DPPC y a partir de la fase LC para DMPC. Se observa una dependencia en la incorporación de MB dependiente de la fase en que se encuentra el DPPC.

Las bicapas fabricadas son frágiles ante la exposición al aire, razón por la cual se las debe manipular siempre en medio acuoso.

La interacción entre DPPC y MB es débil, sin embargo su incorporación en el modelo de membrana es significativa, favorecida por el gradiente de potencial electroquímico.

## 6.6 Referencias

1. Girard-Egrot, A. P.; Blum, L. J. (2007) Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes, in *Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes* (Martin, D. K., Ed.), Springer, New York.
2. Ulman, A. (1991) *An introduction to Ultrathin Organic Films: from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press Inc., San Diego.
3. Blodgett, K. B. (1935) Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface, *J. Am. Chem. Soc.* **57**, 1007-1022.
4. Möhwald, H. (1995) Phospholipid monolayers, in *Structure and Dynamics of Membranes - From Cells to Vesicles* (Möhwald, H., Lipowsky, R., and Sackmann, E., Eds.), pp 161-211, North-Holland.
5. Kaganer, V. M.; Möhwald, H.; Dutta, P. (1999) Structure and phase transitions in Langmuir monolayers, *Reviews of Modern Physics* **71**, 779-779.
6. Vollhardt, D. (1996) Morphology and phase behavior of monolayers, *Adv. Colloid Interface Sci.* **64**, 143-171.
7. Kjaer, K.; Als-Nielsen, J.; Helm, C. A.; Laxhuber, L. A.; Möhwald, H. (1987) Ordering in Lipid Monolayers Studied by Synchrotron X-Ray Diffraction and Fluorescence Microscopy, *Phys. Rev. Lett.* **58**, 2224-2224.
8. Lösche, M.; Duwe, H. P.; Möhwald, H. (1988) Quantitative analysis of surface textures in phospholipid monolayer phase transitions, *J. Colloid Interface Sci.* **126**, 432-444.
9. McConnell, H. M. (1991) Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water interface, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **42**, 171-195.
10. McConnell, H. M.; Tamm, L. K.; Weis, R. M. (1984) Periodic structures in lipid monolayer phase transitions, *Proc. Nac. Acad. Sci. (USA)* **81**, 3249-3253.
11. Albrecht, O.; Gruler, H.; Sackmann, E. (1978) Polymorphism of phospholipid monolayers, *Journal de Physique* **39**, 13-13.
12. Plant, A. L. (1993) Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold, *Langmuir* **9**, 2764-2767.
13. Castellana, E. T.; Cremer, P. S. (2006) Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design, *Surf. Sci. Rep.* **61**, 429-444.
14. Rao, N. M.; Plant, A. L.; Silin, V.; Wight, S.; Hui, S. W. (1997) Characterization of biomimetic surfaces formed from cell membranes, *Biophys. J.* **73**, 3066-3077.
15. Hubbard, J. B.; Silin, V.; Plant, A. L. (1998) Self assembly driven by hydrophobic interactions at alkanethiol monolayers: mechanism of formation of hybrid bilayer membranes, *Biophys. Chem.* **75**, 163-176.
16. Madhusudhana Rao, N.; Silin, V.; Ridge, K. D.; Woodward, J. T.; Plant, A. L. (2002) Cell membrane hybrid bilayers containing the G-protein-coupled receptor CCR5, *Anal. Biochem.* **307**, 117-130.
17. Meuse, C. W.; Niaura, G.; Lewis, M. L.; Plant, A. L. (1998) Assessing the Molecular Structure of Alkanethiol Monolayers in Hybrid Bilayer Membranes with Vibrational Spectroscopies, *Langmuir* **14**, 1604-1611.
18. Tarek, M.; Tu, K.; Klein, M. L.; Tobias, D. J. (1999) Molecular Dynamics Simulations of Supported Phospholipid/Alkanethiol Bilayers on a Gold(111) Surface, *Biophys. J.* **77**, 964-972.

19. Anderson, N. A.; Richter, L. J.; Stephenson, J. C.; Briggman, K. A. (2006) Determination of Lipid Phase Transition Temperatures in Hybrid Bilayer Membranes, *Langmuir* 22, 8333-8336.
20. Anderson, N. A.; Richter, L. J.; Stephenson, J. C.; Briggman, K. A. (2007) Characterization and control of lipid layer fluidity in hybrid bilayer membranes, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2094-2100.
21. Gregory, B. W.; Dluhy, R. A.; Bottomley, L. A. (1994) Structural characterization and nanometer-scale domain formation in a model phospholipid bilayer as determined by infrared spectroscopy and scanning tunneling microscopy, *J. Phys. Chem.* 98, 1010-1021.
22. Ding, L.; Li, J.; Dong, S.; Wang, E. (1996) Supported phospholipid membranes: comparison among different deposition methods for a phospholipid monolayer, *J. Electroanal. Chem.* 416, 105-112.
23. Hughes, A. V.; Goldar, A.; Gerstenberg, M. C.; Roser, S. J.; Bradshaw, J. (2002) A hybrid SAM phospholipid approach to fabricating a 'free' supported lipid bilayer, *PCCP* 4, 2371-2378.
24. Leverette, C. L.; Dluhy, R. A. (2004) Vibrational characterization of a planar-supported model bilayer system utilizing surface-enhanced Raman scattering (SERS) and infrared reflection-absorption spectroscopy (IRRAS), *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* 243, 157-167.
25. Rana, F. R.; Widayati, S.; Gregory, B. W.; Dluhy, R. A. (1994) Metastability in monolayer films transferred onto solid substrates by the Langmuir-Blodgett method: IR evidence for transfer-induced phase transitions, *Appl. Spectrosc.* 48, 1196-1203.
26. Dicko, A.; Bourque, H.; Pézolet, M. (1998) Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air-water interface and transferred on solid substrates, *Chem. Phys. Lipids* 96, 125-139.
27. Hamelin, A. (1996) Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 1. Behaviour at low-index faces, *J. Electroanal. Chem.* 407, 1-11.
28. Wesolowska, O.; Hendrich, A. B.; Motohashi, N.; Kawase, M.; Dobryszewski, P.; Ozyhar, A.; Michalak, K. (2004) Presence of anionic phospholipids rules the membrane localization of phenothiazine type multidrug resistance modulator, *Biophys. Chem.* 109, 399-412.
29. Prieto, I.; Fernández, A. J.; Mufioz, E.; Martin, M. T.; Camacho, L. (1996) Langmuir-Blodgett films containing water-soluble molecules: the methylene blue-dimyristoyl phosphatidic acid system, *Thin Solid Films* 284-285, 162-165.
30. Varnier Agasoster, A.; Tungodden, L. M.; Cejka, D.; Bakstad, E.; Sydnes, L. K.; Holmsen, H. (2001) Chlorpromazine induced increase in dipalmitoylphosphatidylserine surface area in monolayers at room temperature, *Biochem. Pharmacol.* 61, 817-825.
31. Aoki, P. H. B.; Alessio, P.; Rodríguez-Méndez, M. L.; De Saja Saez, J. A.; Constantino, C. J. L. (2009) Taking Advantage of Electrostatic Interactions To Grow Langmuir-Blodgett Films Containing Multilayers of the Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylglycerol, *Langmuir* 25, 13062-13070.
32. Aoki, P. H. B.; Volpati, D.; Caetano, W.; Constantino, C. J. L. (2010) Study of the interaction between cardiolipin bilayers and methylene blue in polymer-based Layer-by-Layer and Langmuir films applied as membrane mimetic systems, *Vib. Spectrosc* 54, 93-102.
33. Rodríguez-Amaro, R.; Muñoz, E.; Ruiz, J. J.; Avila, J. L.; Camacho, L. (1993) Cyclic voltammetric study of mixed monolayers of methylene blue and Triton X-100 formed spontaneously on mercury, *J. Electroanal. Chem.* 358, 127-142.
34. Frenzel, J.; Arnold, K.; Nuhn, P. (1978) Calorimetric, <sup>13</sup>C NMR, and <sup>31</sup>P NMR studies on the interaction of some phenothiazine derivatives with dipalmitoyl phosphatidylcholine model membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 507, 185-197.
35. Rosso, J.; Zachowski, A.; Devaux, P. F. (1988) Influence of chlorpromazine on the transverse mobility of phospholipids in human erythrocyte membrane: relation to shape changes, *Biochim. Biophys. Acta* 942, 271-279.
36. Nerdal, W.; Gundersen, S. A.; Thorsen, V.; Hoiland, H.; Holmsen, H. (2000) Chlorpromazine interaction with glycerophospholipid liposomes studied by magic angle spinning solid state <sup>13</sup>C-NMR and differential scanning calorimetry, *Biochim. Biophys. Acta* 1464.

# Capítulo 7

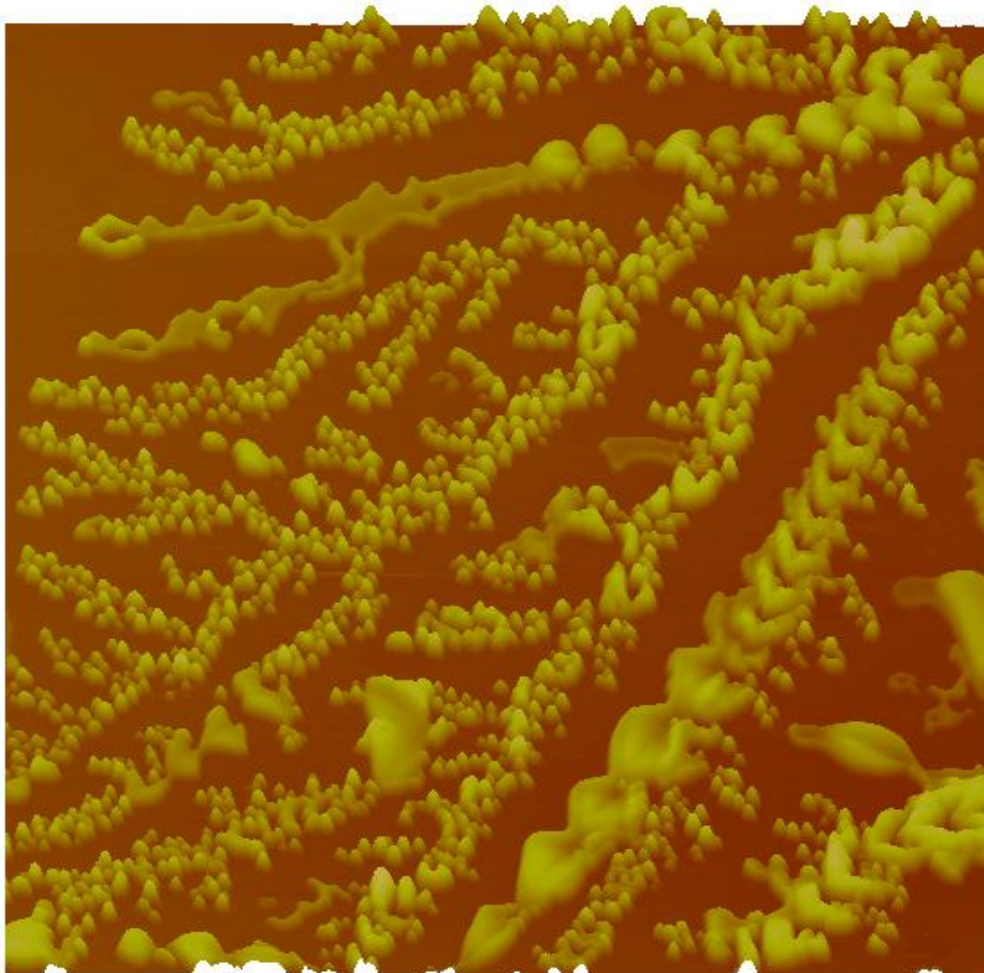
Conclusiones generales



*“The Road goes ever on and on down from the door where it began. Now far ahead the Road has gone, and I must follow, if I can, pursuing it with eager feet, until it joins some larger way where many paths and errands meet. And whither then? I cannot say.”*

The Fellowship of the Ring – J. R. R. Tolkien

(“El camino sigue y sigue desde la puerta en donde comenzó. Ahora el camino se extiende a lo lejos y debo continuar, si puedo, siguiendo con pie decidido, hasta que se una a un camino mayor donde se encuentren varias sendas y afanes. ¿Y después de allí? No lo puedo decir.”)



*“I will follow”*

U2 (1980)

Las SAMs de alcanotioles son un sistema de preparación sencillo que permite el estudio metódico sobre una superficie perfectamente controlada. Sobre estos sistemas es posible evaluar la inmovilización de biomoléculas, con propiedades redox y ópticas, a través de su respuesta a la transferencia de carga y señales Raman.

Por otro lado, las SAMs de alcanoditioles requieren mayores cuidados en su preparación dependiendo del resultado deseado, es decir, si se prefiere una SAM en configuración paralela o vertical. Para ello, se debe tener en cuenta el largo de cadena y las condiciones de ensamblado (concentración, solvente, atmósfera). De estos estudios, surgió la elección del ditiotreitól como molécula formadora de SAMs hidrofílicas, debido a su tendencia a formar fases paralelas.

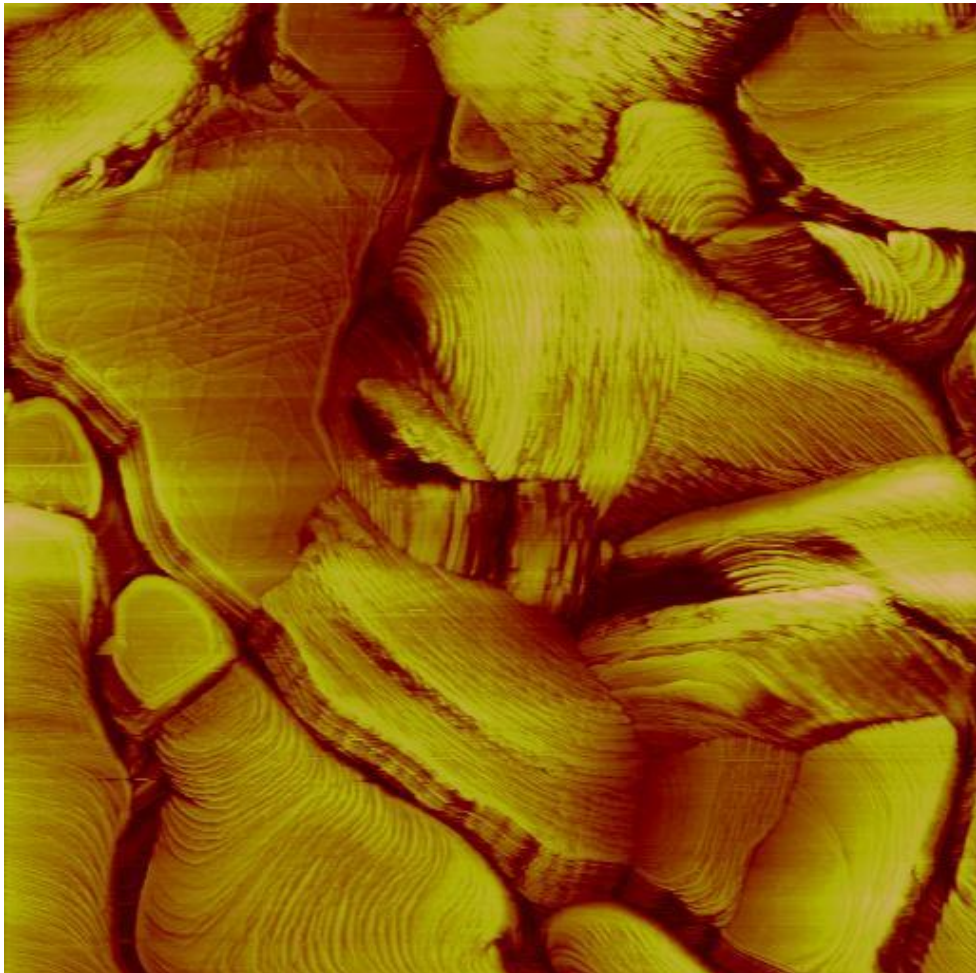
Las SAMs de DTT posibilitan la fusión de vesículas de DMPC para formar bicapas soportadas. Las bicapas formadas son fluidas como para permitir el pasaje por difusión del MB y libres de defectos tales que permitan la detección del FAD. El método se puede extender a vesículas funcionalizadas con un fotosensibilizador como ZnPc de manera de cuantificarlo.

Por último, se pueden formar bicapas híbridas entre monocapas de alcanotioles y monocapas de fosfolípidos, controlando la fase en la cual se depositan mediante la técnica de Langmuir-Blodgett. Estas bicapas tienen control lateral de fluidez, observándose una permeación diferencial del MB en cada fase ensayada.

Los sistemas de bicapas preparados en este trabajo de Tesis constituyen modelos que se asemejan a las estructuras básicas de las biomembranas, con los cuales se pudieron analizar aspectos fundamentales de su comportamiento. Este tipo de modelos podría emplearse para estudios acerca del transporte molecular transmembrana o bien para la incorporación y liberación controlada de fármacos. Además, pueden ser considerados como plataformas para el desarrollo de biosensores electroquímicos u ópticos, ya que por su diseño, sería posible incorporar elementos de bio-reconocimiento.

# Apéndice

Publicaciones



*"Fields of gold"*

Sting (1993)

## Self-Assembly of Alkanedithiols on Au(111) from Solution: Effect of Chain Length and Self-Assembly Conditions

María Antonieta Daza Millone,<sup>†</sup> Hicham Hamoudi,<sup>§,||</sup> Luis Rodríguez,<sup>‡</sup> Aldo Rubert,<sup>†</sup> Guillermo A. Benítez,<sup>†</sup> María Elena Vela,<sup>†</sup> Roberto C. Salvarezza,<sup>†</sup> J. Esteban Gayone,<sup>‡</sup> Esteban A. Sánchez,<sup>‡</sup> Oscar Grizzi,<sup>‡</sup> Céline Dablemont,<sup>§,||</sup> and Vladimir A. Esaulov\*,<sup>§,||</sup>

<sup>†</sup>Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina,

<sup>‡</sup>Centro Atómico Bariloche, Instituto Balseiro, CNEA, UNCuyo, CONICET, 8400 S.C. de Bariloche, Río Negro, Argentina, <sup>§</sup>Université-Paris Sud and <sup>||</sup>CNRS, UMR 8625, Laboratoire des Collisions Atomiques et Moléculaires, LCAM, Bâtiment 351, UPS-11, 91405 Orsay, France

Received May 5, 2009. Revised Manuscript Received August 24, 2009

A comparative study on the adsorption of butanedithiol (BDT), hexanedithiol (HDT), and nonanedithiol (NDT) on Au(111) from ethanolic and *n*-hexane solutions and two different preparation procedures is presented. SAM characterization is based on reflection–absorption infrared spectroscopy, electrochemistry, X-ray photoelectron spectroscopy, and time of flight direct recoil spectroscopy. Results indicate that one can obtain a standing-up phase of dithiols and that the amount of the precursor lying-down phase decreases from BDT to NDT, irrespective of the solvent and self-assembly conditions. A good ordering of the hydrocarbon chains in the standing-up configuration is observed for HDT and NDT when the system is prepared in degassed *n*-hexane with all operations carried out in the dark. Disulfide bridges at the free SH terminal groups are formed for HDT and to a lesser extent for NDT prepared in ethanol in the presence of oxygen, but we found no evidence of ordered multilayer formation in our experiments. No disulfides were observed for BDT that only forms the lying-down phase. Our results demonstrate the key role of the chain length and the procedure (solvent nature and oxygen presence) in controlling the surface structure and chemistry of SAMs dithiols on Au(111).

### 1. Introduction

Dithiols and self-assembled monolayers (SAMs) of these molecules have attracted much attention because of the possibility of using them as linkers between two metallic entities: nanoparticles or metallic surfaces or thin films.<sup>1–5</sup> This is possible because of the availability of two functional SH groups. Numerous reports on the preparation and application of dithiol SAMs are available in the literature. However, in spite of the relatively large amount of work done, the conditions for the reproducible formation of well-ordered SAMs with free SH end-groups have been the object of much debate.<sup>6–12</sup> One of the problems is related to the formation of an initial lying-down phase with the two mercapto groups of the molecule bound to the surface that renders the development of a standing-up phase more complex,<sup>6</sup>

than that observed for alkanethiols self-assembly, where only one mercapto group per molecule exists.<sup>13–27</sup> Thus, one could obtain mixed lying-down and standing-up phases.<sup>28,29</sup> The other aspect is related to the possibility of the degradation of the SAMs by

\*Corresponding author.

(1) Sarathy, K. V.; Thomas, P. J.; Kulkarni, G. U.; Rao, C. N. R. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 399–401.

(2) Ohgi, T.; Sheng, H. Y.; Nejoh, H. *Appl. Surf. Sci.* **1998**, *130–132*, 919–924.

(3) Sakotsubo, Y.; Ohgi, T.; Fujita, D.; Ootuka, Y. *Physica E* **2005**, *29*, 601–605.

(4) Sakotsubo, Y.; Ohgi, T.; Fujita, D.; Ootuka, Y. *Appl. Surf. Sci.* **2005**, *241*, 33–37.

(5) Ji, H.-F.; Zhang, Y.; Purushotham, V. V.; Kondu, S.; Ramachandran, B.; Thundat, T.; Haynie, D. T. *The Analyst* **2005**, *130*, 1577–1579.

(6) Liang, J.; Rosa, L. G.; Scoles, G. J. *Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 17275–17284.

(7) Tai, Y.; Shaporenko, A.; Rong, H. T.; Buck, M.; Eck, W.; Grunze, M.; Zharnikov, M. J. *Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 16806–16810.

(8) Niklewski, A.; Azzam, W.; Strunskus, T.; Fischer, R. A.; Woll, C. *Langmuir* **2004**, *20*, 8620–8624.

(9) Yang, Y.-C.; Lee, Y.-L.; Yang, L.-Y. O.; Yau, S.-L. *Langmuir* **2006**, *22*, 5189–5195.

(10) Pasquali, L.; Terzi, F.; Seeber, R.; Doyle, B. P.; Nannarone, S. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 134711–10.

(11) Pasquali, L.; Terzi, F.; Zanardi, C.; Pigani, L.; Seeber, R.; Paolicelli, G.; Suterin, S. M.; Mahne, N.; Nannarone, S. *Surf. Sci.* **2007**, *601*, 1419–1427.

(12) Pasquali, L.; Terzi, F.; Zanardi, C.; Seeber, R.; Paolicelli, G.; Mahne, N.; Nannarone, S. *J. Phys.: Condens. Matter* **2007**, *19*, 305020–305020.

(13) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559–3568.

(14) Nuzzo, R. G.; Fusco, F. A.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2358–2368.

(15) Nuzzo, R. G.; Dubois, L. H.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 558–569.

(16) Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Tao, Y. T.; Parikh, A. N.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7152–7167.

(17) Hooper, A.; Fisher, G. L.; Konstantinidis, K.; Jung, D.; Nguyen, H.; Opila, R.; Collins, R. W.; Winograd, N.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8052–8064.

(18) Heister, K.; Allara, D. L.; Bahnck, K.; Frey, S.; Zharnikov, M.; Grunze, M. *Langmuir* **1999**, *15*, 5440–5443.

(19) Fisher, G. L.; Hooper, A. E.; Opila, R. L.; Allara, D. L.; Winograd, N. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3267–3273.

(20) Walker, A. V.; Tighe, T. B.; Cabarcos, O. M.; Reinard, M. D.; Haynie, B. C.; Uppili, S.; Winograd, N.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3954–3963.

(21) Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 321–335.

(22) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1170.

(23) Camillone, N., III; Chidsey, C. E. D.; Liu, G.-y.; Putvinski, T. M.; Scoles, G. J. *Chem. Phys.* **1991**, *94*, 8493–8502.

(24) Camillone, N., III; Chidsey, C. E. D.; Liu, G.-y.; Scoles, G. J. *Chem. Phys.* **1993**, *98*, 3503–3511.

(25) Danisman, M. F.; Casalis, L.; Bracco, G.; Scoles, G. J. *Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11771–11777.

(26) Guo, Z.; Zheng, W.; Hamoudi, H.; Dablemont, C.; Esaulov, V. A.; Bourguignon, B. *Surf. Sci.* **2008**, *602*, 3551–3559.

(27) Prato, M.; Moroni, R.; Bisio, F.; Rolandi, R.; Mattered, L.; Cavalleri, O.; Canepa, M. J. *Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 3899–3906.

(28) Kobayashi, K.; Horiuchi, T.; Yamada, H.; Matsushige, K. *Thin Solid Films* **1998**, *331*, 210–215.

(29) Kobayashi, K.; Umemura, J.; Horiuchi, T.; Yamada, H.; Matsushige, K. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1998**, *37*, L297–L299.



formation of sulfonates or disulfide bridges and in some cases multilayers, depending upon the type of solvent used<sup>30–34</sup> and preparation procedures. In a recent paper,<sup>35</sup> it was shown using sum frequency generation (SFG), reflection–absorption infrared spectroscopy (RAIRS), and spectroscopic ellipsometry that well-ordered SAMs of standing-up nonanedithiol (NDT) could be produced in *n*-hexane provided that N<sub>2</sub>-degassed solutions are used and all preparation steps are performed in the absence of ambient light. It was, in particular, observed that exposure to light in ambient conditions led to an attenuation of the SH signal.

In case of alkanethiol self-assembly, it is generally considered<sup>16</sup> that the degree of order in the SAM improves with increasing chain length. In this respect, one can ask oneself whether the quality of a dithiol SAM would worsen with short chain lengths. Many applications in nanotechnology and nanoscience, which requires charge transfer using dithiols as bridges, would be optimized using short molecules in the standing-up configuration. However, in a recent paper it was reported that the shorter hexanedithiol (HDT) only forms an ordered array of lying-down molecules in both gas-phase and liquid environments.<sup>36</sup> On the other hand, standing-up multilayer formation by spontaneous organization of HDT on Au has been reported by other authors.<sup>30</sup> The linking chemistry between layers was proposed to be the oxidative formation of a sulfur–sulfur bond that competes successfully with intralayer S–S bond formation. Therefore, the behavior of HDT molecules on the Au(111) phase deserves particular attention concerning not only the surface structure, but also the SAM chemistry and quality.

In this work, we investigate the HDT adsorption on Au(111) from the liquid phase using two different solvents (*n*-hexane and ethanol) following different procedures described previously in the literature.<sup>35</sup> The results are compared to those obtained for butanedithiol (BDT) and NDT SAMs prepared under the same experimental conditions. A multitechnique approach involving electrochemistry, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), reflection–absorption infrared spectroscopy (RAIRS), and time-of-flight direct recoil spectroscopy (TOF-DRS) is used to analyze the SAMs. The latter combines the ability to detect all elements, including H, which are not detected in most electron spectroscopies, with a very high surface sensitivity (topmost layers) and very low irradiation dose (picoampere currents), thus preventing significant damage of the film. We have used this technique successfully to investigate the adsorption/desorption kinetics of some alkanethiol SAMs.<sup>37–39</sup>

It is found in both solvents that the amount of the lying-down phase decreases sharply from BDT to NDT. In contrast to

previous results,<sup>36</sup> which only reported the existence of the lying-down phase, we observe dominant formation of the standing phase in HDT SAMs in both solvents. A good ordering of the hydrocarbon chains in the standing-up configuration is observed for NDT when the system is prepared in degassed *n*-hexane with all operations carried out in the dark. Disulfide bridges at the free SH terminal groups are formed for HDT and to a lesser extent for NDT prepared in ethanol, but we found no evidence of ordered multilayer formation<sup>30</sup> in our experiments. No disulfides were observed for BDT that only forms the lying-down phase. Our results demonstrate the key role of the chain length and the self-assembly procedure (solvent nature and oxygen presence) in controlling the surface structure and chemistry of SAMs dithiols on Au(111). We also found that *n*-hexane is a promising solvent for the formation of densely packed, well-ordered SAMs when they are prepared in absence of oxygen and light.

## 2. Experimental Section

**2.1. Gold Substrates.** In order to get well-organized SAMs, the quality of the gold surface is a key parameter. Here, we used gold on glass substrates and a gold monocrystal.

The Au(111) sample was obtained from MaTecK GmbH as a single crystal hat-shaped disk (10 mm diameter, 3 mm thick, hat shape with the usable sample face of 8 mm diameter) of 99.999% purity, oriented to within <0.4°. The surface geometry was checked by both LEED and TOF-DRS. In order to reduce the strong effect that surface roughness or contamination may have on the adsorption kinetics, particular care was taken to clean in situ in the high-vacuum chamber the initial crystalline Au surface by cycles of Ar sputtering and annealing to 500 °C.

The gold on glass substrates were made of 0.7-mm-thick borosilicate glass, covered by a 2.5-nm-thick chromium adhesion layer, and by a 250-nm-thick final gold layer. For this work, the substrates were annealed with a H<sub>2</sub> flame during 3 min or in a furnace to 600 °C in order to produce flat terraces with (111) preferred orientation.

It should be noted here that, while in a given laboratory systematically similar preparation conditions are used, morphological differences in samples may exist regarding size of flat domains and small terraces especially on gold on mica substrates. Since RAIRS and TOF-DRS involve grazing scattering conditions, they “see” the top flat terraces as opposed to electrochemistry and XPS, where a fuller picture of the sample is obtained. Since the assembly characteristics on terraces and elsewhere may not be the same, this could affect conclusions from the different techniques. However, the data we present draws a complementary consistent picture.

**2.2. Chemicals.** 1,4-Butanedithiol (BDT), 1,9-nonanedithiol (NDT) 97%, and 1,6-hexanedithiol (HDT) 97% were purchased from Alfa Aesar and Sigma and *n*-hexane 99% from Riedel-de Haën. Some comparative measurements were performed on some alkanethiols. 1-Propanethiol (PT) 99%, 1-butanethiol (BT) 99%, 1-hexanethiol (HT) 95%, 1-nonanethiol (NT) 95%, and 1-decanethiol (DT) 96% were purchased from Sigma and Fluka. All chemicals were used without further purification. All other chemicals were of best analytical grade available.

**2.3. SAMs Preparation.** Alkanethiol SAMs were prepared by immersing the gold support into a freshly prepared 50 μM or 1 mM solution of C<sub>n</sub>SH in ethanol for times ranging from 30 min to 24 h at room temperature in the absence of light. Final rinsing was done with absolute ethanol before drying under N<sub>2</sub>. These measurements were done as a reference for the dithiol SAMs.

In the case of alkanedithiols, SAMs were prepared by two methods. In the first one (procedure I), the Au substrates were immersed in 50 μM dithiol solution in ethanol for 24 h, i.e., following the usual protocol for alkanethiol SAM formation but in the absence of light. In the second one (procedure II), the SAMs were prepared by immersing the Au substrates into a 1 mM

(30) Kohli, P.; Taylor, K. K.; Harris, J. J.; Blanchard, G. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11962–11968.

(31) Carot, M. L.; Esplandiu, M. J.; Cometto, F. P.; Patrito, E. M.; Macagno, V. A. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *579*, 13–23.

(32) Káshammer, J.; Wohlfart, P.; Weiss, J.; Winter, C.; Fischer, R.; Mittler-Neher, S. *Opt. Mater.* **1998**, *9*, 406–410.

(33) Esplandiu, M. J.; Carot, M. L.; Cometto, F. P.; Macagno, V. A.; Patrito, E. M. *Surf. Sci.* **2006**, *600*, 155–172.

(34) Rieley, H.; Kendall, G. K.; Zemicael, F. W.; Smith, T. L.; Yang, S. *Langmuir* **1998**, *14*, 5147–5153.

(35) Hamoudi, H.; Guo, Z.; Prato, M.; Dablemont, C.; Zheng, W. Q.; Bourguignon, B.; Canepa, M.; Esaulov, V. A. *PhysChemChemPhys* **2008**, *10*, 6836–6841.

(36) Leung, T. Y. B.; Gerstenberg, M. C.; Lavrich, D. J.; Scoles, G.; Schreiber, F.; Poirier, G. E. *Langmuir* **2000**, *16*, 549–561.

(37) Rodríguez, L. M.; Gayone, J. E.; Martiarena, M. L.; Sánchez, E. A.; Grizzi, O.; Blum, B.; Salvarezza, R. C.; Xi, L.; Lau, W. M. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2007**, *258*, 183–188.

(38) Rodríguez, L. M.; Gayone, J. E.; Sánchez, E. A.; Grizzi, O.; Blum, B.; Salvarezza, R. C. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7095–7097.

(39) Rodríguez, L. M.; Gayone, J. E.; Sánchez, E. A.; Grizzi, O.; Blum, B.; Salvarezza, R. C.; Xi, L.; Lau, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7807–7813.

solution in *n*-hexane for about 1 h with N<sub>2</sub> bubbling. In this case, we used solutions freshly degassed by N<sub>2</sub> bubbling, and all procedures were carried out in the absence of light. In the case of the volatile hexane, in order to avoid solvent evaporation and consequently a concentration increase in Orsay, hexane was first bubbled with N<sub>2</sub>, then the dithiol was added, and after introduction of the sample, the solution was kept sealed off. In La Plata, N<sub>2</sub> bubbling was maintained during substrate modification, which was performed under a hood in a glass device with a reflux system. It should be noted that *n*-hexane vapors can be explosive and they have toxic effects when inhaled. It is therefore recommended to use appropriate precautions and perform all operations under a hood.

**2.4. Electrochemical Measurements.** Standard three-electrode electrochemical cells were employed with an operational amplifier potentiostat (TEQ-Argentina) with data acquisition capabilities. A saturated calomel electrode (SCE) and a large area platinum foil were used as reference and counter electrode, respectively. All potentials in the text are referred to the SCE scale. The base electrolyte, 0.1 M NaOH aqueous solution, was prepared with Milli-Q water and solid NaOH (analytical grade from Baker) and was degassed with purified nitrogen prior to the experiments. Reductive electrodesorption of thiols from the Au substrates was performed at 0.05 V s<sup>-1</sup> in deaerated aqueous 0.1 M NaOH at room temperature.

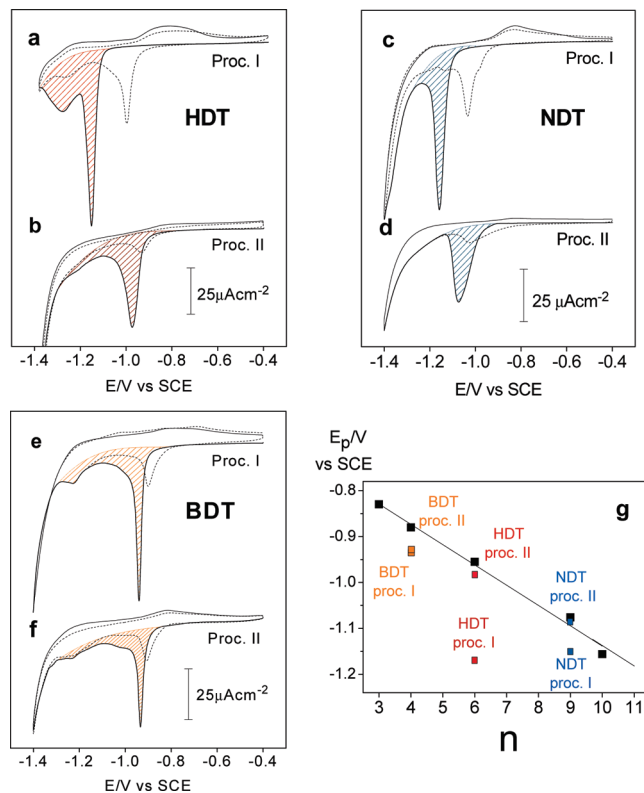
**2.5. XPS Measurements.** The samples were characterized by XPS using a Mg K $\alpha$  source (XR50, Specs GmbH) and a hemispherical electron energy analyzer (PHOIBOS 100, Specs GmbH). A two-point calibration of the energy scale was performed using sputtered cleaned gold (Au 4f<sup>7/2</sup>, binding energy (BE) = 84.00 eV) and copper (Cu 2p<sup>3/2</sup>, BE = 933.67 eV) samples. For spectra deconvolution of the S 2p region, a Shirley-type background was subtracted and a combination of Lorentzian and Gaussian (Voigt) functions was used. The full width at half-maximum (fwhm) was fixed at 1.1 eV and the spin-orbit doublet separation of S 2p signal was set to 1.2 eV. The BEs and peak areas were optimized to achieve the best adjustment.

Sulfur coverage was estimated by the measurement of the areas of Au 4f and S 2p signals corrected by the relative sensitivity factor (RSF) of the elements. Au 4f signal was corrected by the attenuation length for electrons in Au to consider only the signal of the top Au atomic monolayer. Therefore, sulfur coverage is the ratio of sulfur atoms to Au atoms on the surface, taking into account every chemical form of sulfur.

**2.6. Infrared Spectroscopy.** As in our previous work in Orsay the FT-IR spectrometer used for analysis is a Bruker Vertex 70, equipped with a homemade reflection attachment for RAIRS measurements. In this case, the incident angle was 80° to the surface normal. A deuterated triglycine sulfate (DTGS) detector was used to detect either the transmitted or reflected light. For the SAM measurements, the spectral resolution was set to 4 cm<sup>-1</sup>. The spectrometer and sample are flushed first with dry air and during measurements by a N<sub>2</sub> flow.

**2.7. Time of Flight Spectroscopy.** The measurements were carried out on a UHV apparatus equipped for the atomic and electronic spectroscopies (TOF-DRS, AES, and UPS). The UHV chamber is connected to a 1–100 keV ion accelerator through three stages of differential pumping. Details of the experimental setup and the TOF-DRS technique have been described previously.<sup>40</sup>

Briefly, the method consists of bombarding the sample at grazing incidence with a pulsed Ar ion beam. The time-of-flight spectrum of directly recoiled (“sputtered”) fast atoms is measured and allows determination of their mass spectrum. This method combines the ability to detect all elements, including H, which is not detected in most electron spectroscopies, with a very high



**Figure 1.** *j* vs *E* profiles for the reductive desorption of HDT (a,b), NDT (c,d), and BDT (e,f) SAMs from Au (111). Self-assembly conditions were 24 h, 50 μM ethanolic solution in air (a,c,e), and 1 h 1 mM *n*-hexane deoxygenated solution (b,d,f). First scans are in full line and second scans in dashed lines. Integration areas for charge calculation are represented in dashed red, blue, and orange. Measurements were made in 0.1 M NaOH at a sweep rate of 0.05 V s<sup>-1</sup> (g) *E*<sub>p</sub> vs *n* (*n*: number of C atoms) plot derived from reductive polarization curves for alkanethiols (black squares), BDT (orange squares), HDT (red squares), and NDT (blue squares).

surface sensitivity (topmost layers) and very low irradiation dose (picoampere currents), thus preventing significant damage of the film. We have used this technique successfully to investigate the adsorption/desorption kinetics of some alkanethiol SAMs.<sup>37–39</sup>

The ions (Ar<sup>+</sup>), used for sample cleaning and for the TOF-DRS measurements, were produced in a radiofrequency source, mass analyzed with a switching magnet, and finally collimated to better than 0.1°. For TOF-DRS, the Ar beam was pulsed at 30 kHz, with 50 ns width. The system allowed TOF measurements as a continuous function of the scattering angle (within the range of 0° to 70°) by using a rotatable drift tube of 75 cm and also at some fixed scattering angles with a longer flight path for the scattered particles (176 cm for a 30° TOF tube).

### 3. Results

**3.1. Electrochemical Measurements.** **3.1.1. BDT, HDT, and NDT Prepared by Procedure I.** Figure 1a,c,e shows typical cathodic current density (*j*)/potential (*E*) curves (first and second scans) recorded in a 0.1 M NaOH aqueous solution for the different dithiol SAMs prepared by procedure I. The cathodic current peaks preceding the current related to the hydrogen evolution reaction (HER) are assigned to the reductive desorption of dithiols from the Au substrates.<sup>41</sup>

In Figure 1a, a typical desorption curve recorded for a HDT SAM prepared by this procedure is depicted. The first scan shows

(40) Rodríguez, L. M.; Gayone, J. E.; Sánchez, E. A.; Ascolani, H.; Grizzi, O.; Sánchez, M.; Blum, B.; Benítez, G.; Salvarezza, R. C. *Surf. Sci.* **2006**, *600*, 2305–2316.

(41) Vela, M. E.; Martin, H.; Vericat, C.; Andreasen, G.; Hernandez Creus, A.; Salvarezza, R. C. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11878–11882.

a well-defined peak located at  $-1.14$  V followed by a broad and poorly defined peak preceding HER. The overall charge density ( $q$ ), measured by integration of these current peaks referred to the real surface area, yields  $130 \pm 3 \mu\text{C cm}^{-2}$ , a result that exceeds by  $\sim 60\%$  the expected amount for a complete HDT monolayer in standing-up configuration (surface coverage  $1/3$ ,  $q = 75 \mu\text{C cm}^{-241}$ ).

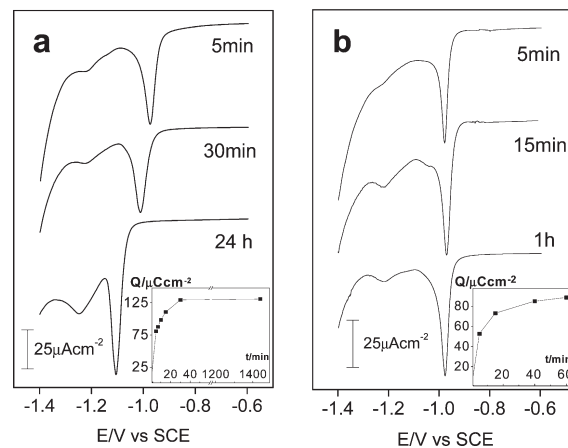
For alkanethiols, we have found that the peak potential  $E_p$  varies linearly with the length of the alkane chain as shown in Figure 1g. Here, we observed a marked shift in the peak potential ( $E_p$ ) of the HDT SAM to more negative values (about  $0.150$  V) with respect to that measured for a hexanethiol (HT) SAM prepared by using the same procedure and substrate (Figure 1g). Significant readsorption of the organic products takes place during repetitive potential scans. The reductive desorption of the readsorbed species (dashed curve in Figure 1a) takes place at  $-0.97$  V, i.e.,  $0.15$  V more positive than that recorded for the first scan and close to the potential corresponding to the HT. These results for the HDT SAMs prepared in ethanol are in good agreement with previous reports for this system.<sup>42</sup>

Similar results to those described for HDT were obtained for NDT prepared by the same procedure (Figure 1c). In fact, for the NDT sample prepared in ethanol we also observed an important  $E_p$  shift in the negative direction ( $0.07$  V) with respect to nonanethiol (NT) (Figure 1g) and also significant readsorption in the second scan. However, in this case the  $q$  value,  $81 \pm 6 \mu\text{C cm}^{-2}$ , is smaller than that observed for HDT and close to the expected value for a dense monolayer of dithiols in standing-up configuration.

On the other hand, for BDT we observe a negative shift in  $E_p$  of  $0.06$  V with respect to butanethiol SAM on Au (111). In this case, the  $q$  value is also found to be  $79 \pm 10 \mu\text{C cm}^{-2}$ . However, for the short BDT the same amount of thiulates is expected for the lying-down and standing-up configurations. In fact, in both cases it is possible to arrange the thiulates in  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° lattice. Therefore, from the electrochemical data we cannot conclude the possible configuration of the BDT molecules. Also, no significant readsorption was observed during repetitive scans (Figure 1e).

In summary, electrochemical data suggest that for HDT and NDT prepared by procedure I the molecules are mostly in standing-up configuration but the free SH groups has been altered by chemical reactions at the outer plane of the SAMs, in agreement with previous works.<sup>33,42</sup> In the case of BDT, we cannot conclude from the electrochemical experiments whether the molecules are in lying-down or standing-up configuration; this will be clarified by XPS data as discussed below.

**3.1.2. BDT, HDT, and NDT Prepared by Procedure II.** In Figure 1b, we show the  $j/E$  profiles recorded for HDT SAMs on Au(111) prepared by procedure II, i.e., in a degassed *n*-hexane solution in the absence of light. In this case, a well-defined peak related to reductive desorption is observed at  $-0.97$  V followed by a small shoulder preceding HER. The  $q$  value is  $81 \pm 4 \mu\text{C cm}^{-2}$ , a figure very close to that expected for an HDT monolayer in a standing-up configuration.<sup>43</sup> The  $E_p$  value is shifted only  $0.02$  V in the negative direction when compared with the HT SAM on Au (Figure 1g). As we observed for electrodesorbed



**Figure 2.**  $j$  vs  $E$  profiles for the reductive desorption of HDT SAMs from Au (111) for different immersion time. Self-assembly conditions were (a) HDT  $50 \mu\text{M}$  ethanolic solution in air and (b) HDT  $1 \text{ mM}$  *n*-hexane deoxygenated solution. Insets show  $q$  vs  $t$  plots for each case. Measurements were made in NaOH  $0.1 \text{ M}$  at a sweep rate of  $0.05 \text{ V s}^{-1}$ .

alkanethiols,<sup>44</sup> no significant readsorption was detected during repetitive electrode cycling.

On the other hand, for NDT SAMs (Figure 1b) we found a smaller  $q$  value ( $q = 60 \pm 5 \mu\text{C cm}^{-2}$ ) than that measured for HDT, and also a negligible  $E_p$  shift with respect to the corresponding alkanethiolate (Figure 1g).

Finally, for BDT SAMs (Figure 1f) the same results described for the self-assembly of this dithiol by procedure I were observed (Figure 1e). In fact, we found a negative shift in  $E_p = 0.05$  V with respect to butanethiolate on Au(111) and no significant readsorption, although  $q$  is slightly smaller ( $q = 70 \pm 10 \mu\text{C cm}^{-2}$ ) than that observed for BDT prepared by procedure I.

The main conclusion for dithiol self-assembly by procedure II is that no clear evidence about chemical transformation of the terminal SH groups can be found in the electrochemical experiments.

**3.1.3. Immersion Time Dependence of the HDT Reductive Desorption Curves.** In Figure 2a, we have plotted electrodesorption curves for Au surfaces immersed for different times ( $t_i$ ) in  $50 \mu\text{M}$  HDT ethanolic solutions following procedure I. It is evident that as  $t_i$  is increased  $E_p$  shifts from  $-0.97$  V to  $-1.105$  V while  $q$  increases from  $55 \mu\text{C cm}^{-2}$  to  $130 \mu\text{C cm}^{-2}$ . On the other hand, in similar experiments made in *n*-hexane solutions by procedure II (Figure 2b), no shift in  $E_p$  is observed and the increase in  $q$  is from  $53 \mu\text{C cm}^{-2}$  to  $80 \mu\text{C cm}^{-2}$ .

The smaller values in both solvents observed at shorter times, are consistent with what is expected in the model presented in ref 36 for HDT in lying-down configuration. The second value, mentioned above, in the case of *n*-hexane agrees with that expected for a close-packed  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° HDT lattice (surface coverage  $\theta_{\text{DS}} = 1/3$ ) with the molecules in the vertical configuration,<sup>43</sup> while for HDT adsorption from the ethanolic solution  $q$  largely exceeds this value.

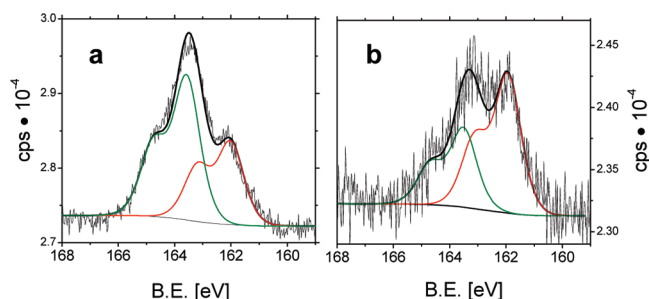
These results for HDT suggest that irrespective of the self-assembly procedure the molecules first arrange in lying-down configuration and then rearrange into a dense dithiol layer consisting mainly of molecules in standing-up configuration. In the ethanol solution, the standing-up HDT phase is formed more rapidly (less than 10 min; the time needed to attain  $80 \mu\text{C cm}^{-2}$ ) than in *n*-hexane (40 min) despite the higher HDT concentration in this solvent. However, for  $t > 10$  min the SAM formed in ethanol is transformed into a structure containing an excess of

(42) Esplandiu, M. J.; Hagenstrom, H.; Kolb, D. M. *Langmuir* **2001**, *17*, 828–838.

(43) Vericat, C.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. *PhysChemChemPhys* **2005**, *7*, 3258–3268.

(44) Terán Arce, F.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C.; Arvia, A. J. *Langmuir* **1998**, *14*, 7203–7212.





**Figure 3.** S 2p XPS spectra of HDT SAMs (a) SAMs obtained after 24 h incubation in 50  $\mu$ M ethanolic solution (procedure I), (b) SAMs obtained after 1 h incubation in 1 mM *n*-hexane solution (procedure II). Red: 162 eV component. Green: 163.5 eV component.

S-containing organic products. Therefore, in order to analyze the nature of the S-containing molecules on the Au (111) surface XPS measurements were made.

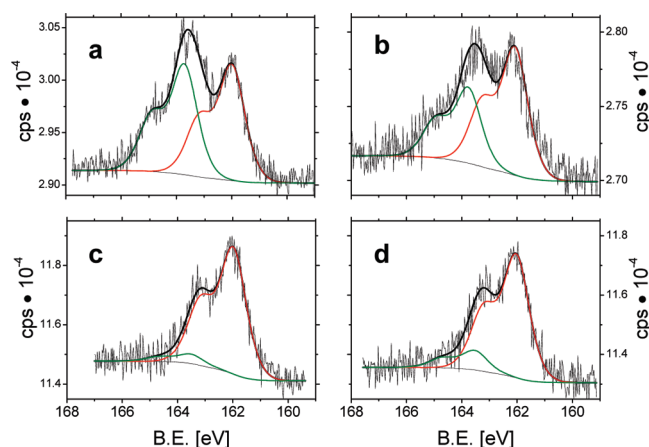
### 3.2. XPS Data. 3.2.1. HDT SAMs from Procedure I.

The XPS S 2p spectra for the HDT SAMs on Au (111) prepared by procedure I are shown in Figure 3a. The broad S 2p signal, typical of metals covered by SAMs, can be fitted with two doublet components located at 162.0 and 163.5 eV. The first component (162 eV) corresponds to thiols adsorbed on metals, while the component at 163.5 eV can be assigned to free thiol (SH) groups or disulfides.<sup>45</sup>

The coverages of the standing-up and lying-down phases were evaluated in two different ways depending upon the S 2p (163.5 eV)/S 2p (162 eV) ratio.

- If the ratio of the S 2p signal at 163.5 eV with respect to 162 eV was higher than that expected for all the molecules in the standing-up position, we calculate the coverage of standing-up molecules from the ratio S 2p (162 eV)/Au 4f (84 eV) and assign the excess of S 2p (163 eV) to free dithiols or disulfides.
- If the S 2p (163.5 eV)/S 2p (162 eV) ratio was lower than that expected for the all standing-up configuration, then we calculate the standing-up phase coverage from the signal of S 2p at 163.5 eV and the excess of S 2p (162 eV) was assigned to lying-down dithiol molecules.

By using these rules, the total coverage by dithiol molecules for the HDT SAM formed in ethanol by procedure I is found to be  $\theta_{DS} = 0.41 \pm 0.03$ , exceeding by 24% that expected for a complete monolayer of HDT in the standing-up configuration ( $\theta_{DS} = 0.33$ ) formed on Au (111).<sup>43</sup> The amount of thiols calculated from the signal at 162 eV coincides with that expected for a monolayer of thiols in vertical configuration forming a  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° surface structure prepared by the same self-assembly procedure.<sup>46,47</sup> Therefore, the excess of molecules is related to the 163.5 eV component. In principle, this signal should be assigned to free HDT molecules or disulfide species. However, repetitive rinsing with pure solvent does not reduce the intensity of the 163.5 eV signal, so we conclude that we do not have any physisorbed dithiols in the SAM. Therefore, the 163.5 eV signal contains the contribution of *extra* HDT molecules bonded to the terminal group of the thiolate SAM by S–S bonds. The presence of



**Figure 4.** S 2p XPS spectra of NDT SAMs. (a) SAMs obtained after 24 h incubation in 50  $\mu$ M ethanolic solution (procedure I), (b) SAMs obtained after 1 h immersion in 1 mM *n*-hexane solution (procedure II). S 2p XPS spectra of BDT SAMs (c) SAMs obtained by procedure I, (d) SAMs obtained by procedure II. Red: 162 eV component. Green: 163.5 eV component.

disulfide bonds is also supported by the extra charge needed in the reductive desorption experiments (section 3.1, Figures 1a and 2a). In fact, it is well-known that electrolytic cleavage of disulfide bonds at a mercury pool cathode can be used to measure the total amount of disulfide bonds in proteins.<sup>48</sup>

Therefore, these results suggest that HDT SAMs prepared by procedure I form a complex adlayer consisting of a monolayer of HDT molecules bonded to the gold substrate by thiols ( $\theta_{DS} = 0.33$ ), and also HDT molecules bonded by disulfide S–S bonds at the SAM surface and/or extra HDT molecules strongly bonded to the terminal group of the layer by S–S bonds ( $\theta_{DS} = 0.08 \pm 0.03$ ). The latter explain the larger 163.5 eV signal in XPS.

It should be mentioned that in our series of measurements the HDT samples in ethanol only occasionally exhibit the presence of sulfonates (167 eV) due to the oxidation of the outermost S moiety, at least for 24 h of incubation in this solvent.<sup>49</sup>

**3.2.2. HDT SAMs from Procedure II.** XPS data obtained for HDT SAMs prepared by procedure II are shown in Figure 3b. Also, in these samples we observe the 162.0 eV (thiols) and 163.5 eV components. The coverage by dithiol molecules estimated by the S/Au ratio is  $\theta_{DS} \approx 0.23 \pm 0.03$ , a figure smaller than that expected for close-packed HDT SAM with molecules in a vertical configuration. The analysis of the two components (162/163.5 eV ratio) indicates that there is an excess of the 162 eV signal (thiols) with respect to that expected for a standing-up monolayer of HDT. The excess of thiols and the smaller value of  $\theta_{DS}$  suggests that the HDT SAM contains some mixed domains of standing-up and lying-down molecules. Considering the excess of thiols (from the 162/163.5 signal ratio), we estimate a surface coverage  $\theta_{DS} = 0.15 \pm 0.04$  for the standing-up phase and  $\theta_{DS} = 0.08 \pm 0.04$  for the lying-down phase. The 163.5 eV component can be assigned to the free SH terminal group of the molecules in standing-up configuration based on the electrochemical data that show no evidence of extra-charge and  $E_p$  shift during the reductive desorption.

**3.2.3. BDT and NDT SAMs.** XPS spectra for NDT and BDT are shown in Figure 4. In the case of NDT, both procedures lead to  $\theta_{DS}$  values slightly smaller than that expected for a full

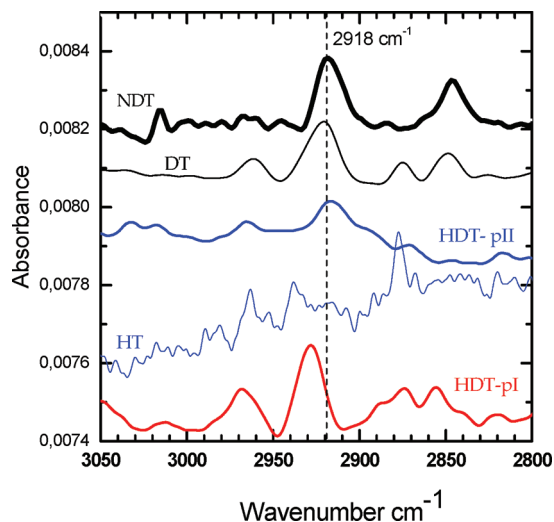
(45) Lindberg, B. J.; Hamrin, K.; Johansson, G.; Gelius, U.; Fahlman, A.; Nordling, C.; Siegbahn, K. *Phys. Scr.* **1970**, *1*, 286–298.

(46) Vericat, C.; Benitez, G. A.; Grumelli, D. E.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. *J. Phys.: Condens. Matter* **2008**, *20*, 184004–184004.

(47) Cortés, E.; Rubert, A. A.; Benitez, G.; Carro, P.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. *Langmuir* **2009**, *25*, 5661–5666.

(48) Weitzman, P. D. *Anal. Biochem.* **1976**, *76*, 170–6.

(49) Aqua, T.; Cohen, H.; Vilan, A.; Naaman, R. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 16313–16318.



**Figure 5.** RAIRS spectra for HDT and NDT SAMs prepared by procedure II (in a degassed *n*-hexane solution and in the dark) and for HDT prepared by procedure I. Also shown are spectra for HT and DT SAMs prepared by procedure I.

standing-up phase. The XPS data also show that the NDT SAM prepared by procedure II exhibits a higher fraction of standing-up molecules than that found for HDT SAM prepared under the same experimental conditions.

Finally, for BDT SAMs (Figure 4c,d) only the S 2p 162 eV signal is significant irrespective of the self-assembly procedure. This result clearly indicates that BDT remains mainly chemisorbed in the lying-down configuration with two thiolate-Au bonds per molecule. This behavior differs from that reported for butanethiol on Au (111) for which the dense standing phase is easily obtained.<sup>44</sup> Note that although we observe some  $E_p$  shift in the electrochemical data for these samples it is evident that it is not related to disulfide formation, as the contribution of the 163 eV component is negligible.

We can conclude from the electrochemical and XPS data that SAMs prepared by procedure II are of a better quality, as we cannot detect excess in the 163.5 eV component related to disulfide formation, and furthermore the important role of chain length to determine the configuration of the dithiol molecules on the Au (111) surface.

In the following, we investigate the order in the SAMs by RAIRS and the presence of sulfur at the outmost part of the SAMs by TOF-DRS.

**3.3. RAIRS Measurements.** RAIRS spectra on NDT SAMs grown by procedure II (degassed *n*-hexane and with all processing done in the dark) have been reported previously.<sup>35</sup> Here, we performed similar measurements for HDT and compared with the result of growth by procedure I. The RAIRS spectra for HDT, NDT,<sup>35</sup> and also HT and decanethiol (DT) SAMs are shown in Figure 5. The DT and HT spectra are in agreement with existing literature,<sup>14</sup> with only a weak signal observable for the  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  peak for HT.

The dithiol spectra display a peak corresponding to symmetric  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  at 2918  $\text{cm}^{-1}$ . We also observe a peak at 2850  $\text{cm}^{-1}$  for the symmetric stretch  $\nu_s(\text{CH}_2)$ . As discussed in our previous work,<sup>35</sup> these values correspond to a well-organized SAM. Indeed, in disordered SAMs these values tend to 2926  $\text{cm}^{-1}$  and 2855  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, as in the gas phase.<sup>35</sup>

In RAIRS, we do not observe the SH peak located at 2565  $\text{cm}^{-1}$ . As noted previously, this is probably due to the fact that this signal remains weak by comparison to the CH vibration

signals, as seen in the gas phase. SH vibrations were observed for the NDT SAM by SFG as reported previously.

The results for the samples prepared by procedure II are reproducible though the quality of assembly judged by RAIRS peak position could vary, with the peak found between 2918 and 2921  $\text{cm}^{-1}$  (a variability that can also be observed for alkanethiols). In some cases, we observe rather broad spectra indicating disorder at the SAM, which might be due to some variations in preparation conditions regarding, e.g., degassing. As shown by us previously, without degassing and in presence of light well-ordered SAMs are not obtained.<sup>35</sup>

On the other hand, for HDT SAMs prepared by procedure I (with and without degassing the solution), we could not obtain spectra consistent with well-ordered hydrocarbon chains as shown in Figure 5. In fact, in this case we observe the  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  at 2926  $\text{cm}^{-1}$ . Similar results were obtained for NDT SAM prepared by this procedure. The disorganizing effect of ethanol on the order of NT SAMs has also been observed by in situ X-ray diffraction experiments.<sup>50</sup> One can also note that the intensity of the  $\nu_{as}(\text{CH}_2)$  at 2926  $\text{cm}^{-1}$  for the HDT SAM is larger than that observed for the HDT SAM prepared by procedure II. This result suggests an excess of molecules, a result consistent with the electrochemical data.

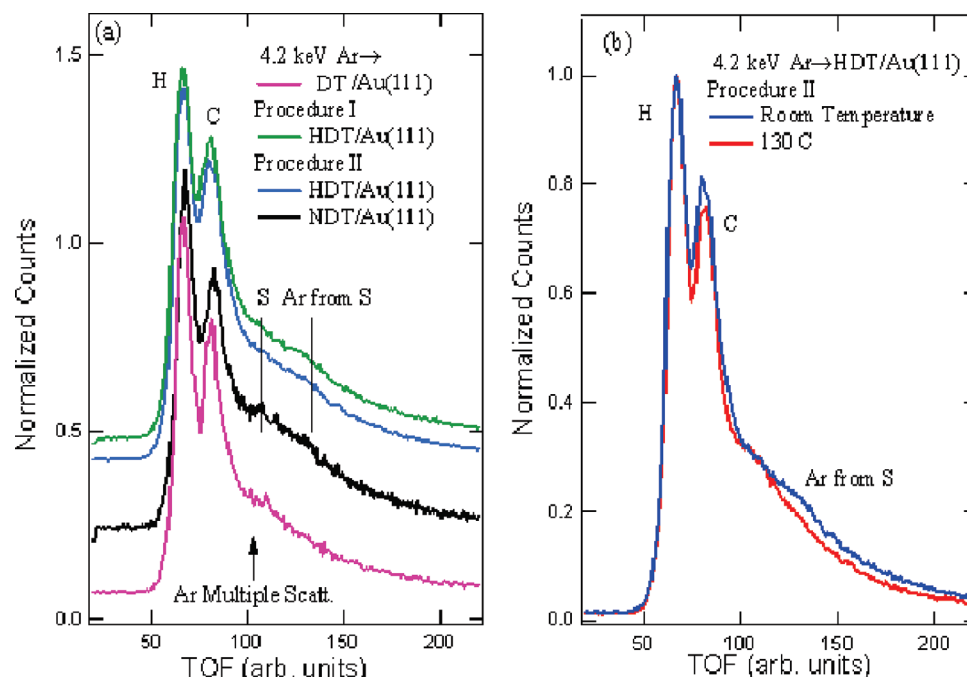
The presence HDT molecules bonded by disulfide S–S bonds at the SAM surface and also extra HDT molecules strongly bonded to the SH terminal group of the layer by S–S bonds (SH–R–S–S–R–S–Au) contribute to the disorder observed by RAIRS.

**3.4. TOF-DRS Analysis.** TOF-DRS measurements were performed in order to ascertain the presence of sulfur atoms on top of the SAMs. In previous studies,<sup>40</sup> on alkanethiol SAMs we have not detected S atoms both for the lying-down phase and the standing-up phase. In the lying-down phase, chemisorbed S atoms are shadowed by both hydrocarbon chains, and in the standing-up phase, the S atoms lie below the hydrocarbon chain and are not accessible to the Ar ion beam.

The dithiol SAMs prepared from *n*-hexane and ethanol solutions were transferred rapidly into the UHV setup, and time-of-flight measurements of recoiled and scattered particles were performed. Figure 6a shows TOF-DRS spectra for HDT and NDT SAMs acquired at an incidence angle of 5° measured from the surface. This low incidence angle increases the sensitivity of the technique to the outermost top layer of atoms, which is desirable to identify if there are dithiol molecules with the SH group on the top atomic layer, as expected in the case of the standing-up phase. For comparison purposes, a TOF-DRS spectrum of a decanethiol SAM grown in vacuum is also included in Figure 6a.

The spectra of Figure 6a present two intense peaks at low times of flight. These correspond to H and C recoils. At higher times of flight, a very small Ar multiple scattering (MS) peak, corresponding to collisions of the projectile with the adsorbed molecules, can be discerned in the case of the decanethiol (DT) spectrum.<sup>40</sup> For the dithiol SAMs, it is possible to distinguish an additional small broad hump and, in the case of NDT SAM, two more clearly pronounced structures identified in the figure. These structures correspond to Ar scattering on S atoms and to recoiled S atoms, and is clear proof that there are S atoms located at the top of the dithiol monolayer. These results are in agreement with the RAIRS, XPS, and electrochemistry data presented above, and also suggest the formation of standing-up dithiol layers. Note that for the thiol SAM spectrum no hump is observed, since the S atoms are lying below the hydrocarbon chain and are not accessible to the Ar ion beam.

(50) Capitán, M. J.; Álvarez, J.; Calvente, J. J.; Andreu, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 6166–6169.



**Figure 6.** (a) TOF-DRS spectra for Ar scattering on decanethiol (DT), nonanedithiol (NDT), and hexanedithiol (HDT) SAMs taken at room temperature prepared by procedures I and II as indicated. (b) TOF-DRS spectra for Ar scattering on a hexanedithiol (HDT) SAM at room temperature and after increasing the sample temperature to 130 °C.

It should be pointed out that the S features are weak and rather broad, and their intensity varied for different SAMs samples. In comparison, we have found much better defined peaks when the dithiol molecule adsorption was conducted in vacuum conditions (this study will be discussed in greater detail in a forthcoming paper).<sup>51</sup> The weakness of the structures may be related to the partial degradation of the layers when transported from the solution into the vacuum setup. In some cases, no structures could be observed. In our previous paper,<sup>35</sup> we had pointed out that SH vibrational signals could disappear in ambient conditions, because of photooxidation. This could lead to shadowing of sulfur atoms by oxygen.

We also studied alteration in spectra as a function of temperature. For alkanethiol SAMs, it has been noted that a change in the layer structure occurs at about 100 °C. This has been attributed to an initial desorption and disordering of the layer, which may lead to formation of a lying-down phase.<sup>36</sup> In order to investigate the temperature effect, we have heated the dithiol SAM inside the UHV chamber and have observed that the structure associated with S atoms disappeared between 100 and 120 °C. In Figure 6b, we compare the spectrum for the HDT SAM measured at room temperature (blue line) to the corresponding one measured at 130 °C (red line), where the S hump is not observed. Since with TOF-DRS we cannot detect S from molecules that are in the lying-down phase,<sup>40</sup> this change in the dithiol spectra with temperature could be associated to a partial desorption of alkanedithiol molecules and formation of a lying-down phase similar to that for alkanethiol SAMs.

#### 4. Discussion

Our results obtained by a number of complementary techniques indicate that chemisorbed dithiols prepared by procedure II move from lying-down configuration (BDT) to standing-up configuration (HDT and NDT) as the hydrocarbon chain length

is increased. For HDT, we found mixed domains of both phases. These results contrast previous ones for HDT including gas-phase and liquid-phase deposition where it is proposed that the striped phases may act as effective kinetic traps preventing the transition to other denser phases,<sup>36</sup> and also other results suggesting the formation of ordered multilayers.<sup>30</sup> On the other hand, for HDT and NDT prepared by procedure I we also found predominant contributions of the standing-up phases. However, in this case the situation is more complex, as disulfide bridges seem to be formed between the terminal SH groups of the dithiol molecules, and for HDT, we observe the presence of extra dithiol molecules on the layer. In the following, we discuss briefly our results for both methods of preparation we investigated.

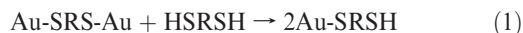
**4.1. Dithiol SAMs from Procedure II.** For NDT and HDT SAMs prepared by procedure II (degassed *n*-hexane solution/dark), the experimental data indicate that the standing-up phase dominates, explaining the TOF-DRS measurements that detect S atoms at the outer part of the SAM. These results for NDT confirm our earlier report based on SFHG, RAIRS, and spectroscopic ellipsometry.<sup>35</sup> The latter indicated formation of a layer whose thickness was compatible with a monolayer. RAIRS results for this procedure indicate formation of well-ordered phases with CH<sub>2</sub> vibrational frequencies lying in the 2918–2921 cm<sup>−1</sup> range. No evidence of oxidized S species was observed by XPS for SAMs prepared by this procedure, in the absence of oxygen and light. Electrochemical and XPS data suggest the presence of small amounts of lying-down molecule domains, which are smaller for the longer NDT molecules. On the other hand, only the lying-down phase is present in BDT SAMs. These results reveal the crucial role of van der Waals interaction not only in assisting the lying-down to standing-up transition (see below), but also to organize the hydrocarbon chains into well-defined crystalline structures.

The fact that a standing-up phase of dithiols can in fact be produced both from solution and, in particular, in adsorption in vacuum from the vapor phase mentioned above,<sup>51</sup> where other types of molecules present in solutions are absent, might appear

(51) Rodríguez, L. M.; Gayone, J. E.; Sánchez, E. A.; Grizzi, O.; Hamoudi, H.; Esaulov, V. A. to be published.



surprising, since we start with the lying-down phase with both S atoms chemisorbed as thiolates. A possible explanation for the existence of the transition to the standing-up phase could be a hydrogen exchange reaction between an incident free (gas phase, or in solution) dithiol molecule with a chemisorbed lying-down dithiolate on Au. This would result in the liberation of one of the ends of the chemisorbed molecule and chemisorption of the free dithiol leading thus to two standing-up chemisorbed dithiols, i.e.



Thereafter, the stability of the standing-up phase would rely on the strength of van der Waals forces. This reaction is now being investigated theoretically.

**4.2. Dithiol SAMs from Procedure I.** In the case of BDT, we observe the same behavior irrespective of the self-assembly procedure. It means that there is no significant solvent effect and oxygen content in the formation of the lying-down phases, where the molecules are strongly bonded by two thiolates to the substrate. On the other hand, results from HDT and NDT, where the molecules adopt the standing-up configuration, demonstrate that the self-assembly procedure becomes crucial to controlling the structure and chemistry of the SAM, as it affects directly the stability of the free SH groups.

Results for HDT and NDT indicate the existence of disulfide bridges between SAM molecules and some extra molecules bonded to the SAM. It is not surprising that disulfide bridges can be formed in ethanol due to the polar nature of the solvent and the presence of oxygen and traces of water. In this solvent, we observe faster self-assembly kinetics than found in *n*-hexane leading to a charge density consistent with the formation of a monolayer of dithiols in standing-up configuration in few minutes (Figure 2a). After the formation of the standing-up phase, a chemical transformation of the SH end group of some molecules into other chemical species takes place. This leads to formation of dithiol bridges and allows attachment of some extra dithiol molecules, although measurements as a function of immersion time described here did not yield results that would be compatible with formation of progressively thicker multilayers as reported elsewhere by some authors.<sup>30</sup> The extra charge in the reductive desorption measurements, the marked shift in the electrodeposition potential, and the presence of an excess of strongly bonded molecules with S 2p signal at 163.5 eV support disulfide formation at the SAM as already reported.<sup>31,42</sup> It should be noted that similar S 2p XPS spectra with large 163 eV contribution have been reported for octanedithiol SAMs on Au (111) prepared from ethanolic solutions, although the possible presence of disulfide was not discussed.<sup>52</sup>

Now, we discuss the formation of disulfide bridges at the free SH groups of the molecules in the standing-up phase when they are prepared by procedure I. It has been reported that the formation of disulfide bonds between adjacent adsorbed dithiolate molecules at a compact monolayer requires a rotation of 180° of one of the alkyl chains with respect to the other, a process that becomes more difficult as the number of C atoms in the hydrocarbon chain increases.<sup>31</sup> Therefore, one could envisage catalyzed reactions leading to dithiol bridges directly between the adsorbed molecules in disordered regions or at domain boundaries through the reaction



Therefore, the amount of disulfide bridges should depend on the SAM quality and on the length of the hydrocarbon chains, although obviously both SAM quality and chain length are closely related.<sup>42</sup>

Disulfide bridges could also be formed by reaction of the terminal SH of the chemisorbed molecules with other dithiol molecules present in the solution as suggested in ref 30, activated by molecules in the solvent (O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O) and light

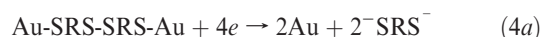


In fact, it is well-known that disulfides species are produced by the reaction of aliphatic and aromatic thiol with oxygen in the presence of metal catalysts.<sup>53</sup> The free SH groups of the added disulfide molecules can undergo a new reaction with other dithiol molecules in solution or form looped structures with adjacent chemisorbed molecules of the SAM leading to a complex and disorganized layer.

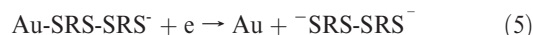
Therefore, in electrochemistry the reductive desorption in alkaline media not only involves



but also the contribution of the reactions<sup>54</sup>



although another possible pathway is possible



The electrochemical cleavage of S–S bonds by reactions 3 and 4 could explain the increase (from ~80 to ~130 μC cm<sup>2</sup>) in the electrochemical charge related to reductive desorption and the marked shifting of the reductive desorption peak in the negative direction. In fact, it has been shown that disulfide species are reduced on mercury electrodes at ~0.25 V more negative than the corresponding thiol. Also, reactions 3 and 4 can explain the significant readsorption observed after reductive desorption of this surface structure due to the greater insolubility of longer disulfide species. Note that a bilayer of lying-down molecules can be discarded, because in this case, no S should be detected in the TOF-DRS spectra.<sup>39</sup>

Taking into account this scenario, we discuss our results for NDT in ethanol. We observed that the total amount of molecules is slightly smaller ( $\theta_{\text{DS}} \approx 0.29$ ) than that corresponding to a complete standing-up phase ( $\theta_{\text{DS}} \approx 0.33$ ). The fact that the amount of charge *q* is greater than that expected for  $\theta_{\text{DS}} \approx 0.29$ , the *E<sub>p</sub>* shift in the negative direction, and the significant readsorption also point out that certain amount of disulfide is also present in the SAMs. The presence of a certain amount of disulfides bonded to the outer plane of the SAM could explain RAIRS data that show no ordering of the hydrocarbon chains.

## 5. Conclusions

The results obtained from our multitechnique study about dithiol SAMs on Au (111) indicate that the amount of the lying-down phase decreases sharply from BDT (most lying down) to

(53) Arisawa, M.; Sugata, C.; Yamaguchi, M. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 6097–6099.

(54) Kizek, R.; Vacek, J.; Trnkova, L.; Jelen, F. *Bioelectrochemistry* **2004**, 63, 19–24.

(52) Fujita, D.; Ohnishi, K.; Ohgi, T. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2002**, 3, 283–287.

NDT (most standing up) irrespective of the self-assembly procedure. A good ordering of the hydrocarbon chains in the standing-up configuration is observed for NDT when the system is prepared in degassed *n*-hexane with all operations carried out in the dark. These results agree with a previous study by some of us for NDT using RAIRS, SFG, and spectroscopic ellipsometry.<sup>35</sup>

A chemical reaction involving hydrogen exchange between an incident free dithiol molecule with a chemisorbed lying-down dithiolate on Au that could explain the transition process from the lying-down phase to standing-up phase is proposed.

In contrast to previous results, we find that HDT SAMs also exhibit a significant contribution of molecules in the standing-up phase. Our data for self-assembly by procedure I also point to the formation of disulfide bridges at the free SH terminal groups at

both HDT and NDT SAMs. However, we found no evidence of ordered multilayer formation in our experiments. No disulfides were observed for BDT, which only form the lying-down phase, prepared by procedure I. Our results demonstrate the key role of chain length and procedure (solvent nature and oxygen presence) in controlling the surface structure and chemistry of dithiols SAMs on Au (111), and explain contradictory results found in the literature for these systems.

**Acknowledgment.** We acknowledge financial support from ANPCyT (Argentina, PICT06-621, PAE 22711, PICT06-715), SeCyT (Argentina) – ECOS (France) Program (no A07E01) and U.N. Cuyo. M. E. Vela is a member of the research career of CIC BsAs. R.C.S is a Guggenheim Foundation Fellow.

# Self-assembled dithiothreitol on Au surfaces for biological applications: phospholipid bilayer formation

Tânia B. Creczynski-Pasa,<sup>a</sup> M. Antonieta Daza Millone,<sup>b</sup>  
Maximiliano L. Munford,<sup>c</sup> Vânia R. de Lima,<sup>a</sup> Tiago O. Vieira,<sup>a</sup>  
Guillermo A. Benitez,<sup>b</sup> André A. Pasa,<sup>\*a</sup> Roberto C. Salvarezza<sup>b</sup>  
and Maria E. Vela<sup>\*b</sup>

Received 17th July 2008, Accepted 5th November 2008

First published as an Advance Article on the web 24th December 2008

DOI: 10.1039/b811964c

Self-assembly of dithiothreitol (DTT) on Au(111) from solution deposition has been studied by X-ray photoelectron spectroscopy and electrochemical data. DTT molecules self-assemble on Au(111) in a lying-down configuration irrespective of the concentration and temperature. XPS and electrochemical data indicate a DTT surface coverage of  $\theta \approx 0.16$  with two S-head–Au covalent bonds per DTT molecule. The DTT monolayer turns the Au surface hydrophilic enough to allow the formation of fluid dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) bilayer domains by vesicle fusion as revealed by *in situ* atomic force imaging. Methylene blue (MB) and flavin adenine dinucleotide (FAD) have been used as probes to study molecule transport across the bilayer.

## 1. Introduction

Lipid membranes of living cells are the most important barriers to control the majority of cellular processes. They play a fundamental role in cell-to-cell communication involving the exchange of ions and biomolecules, including calcium, neurotransmitters, proteins, reactive species, and drugs among others.

Phospholipid bilayers can be taken as a model system of cell membranes because they preserve 2-D fluidity and can be modified with membrane proteins, ion channels, receptors and transporters, and can be used for various biotechnological applications.<sup>1–3</sup> Liposomes, in which phospholipid composition, structure and dynamics can be fully controlled, are generally accepted as a suitable model for *in vitro* studies of cell membrane structures and properties.<sup>4–6</sup> Liposomes are vesicles formed by a lipidic bilayer, structurally similar to the lipidic matrix of a cell membrane. However, to perform studies with atomic force microscopy (AFM), a technique that allows the determination of morphological and mechanical properties of structures, the immobilization of the lipidic bilayer on a solid surface<sup>7–10</sup> is required. There exist several methods to spread phospholipids on a solid substrate in order to achieve a supported bilayer.<sup>11</sup> Among the most widely used methods are sequential transfer of two monolayers from the air–water interface *via* Langmuir–Blodgett (LB) and Langmuir–Schaefer (LS) techniques,<sup>12,13</sup> single bilayer spreading<sup>14</sup> and vesicle fusion.<sup>15</sup>

Lipidic membranes supported on inorganic material surfaces, *e.g.* gold and mica, yield important results related to phase

transition, stability and morphology of the layers and are promising structures for the development of biosensors.<sup>16–18</sup> On these surfaces, however, the physical–chemical properties of the lipidic layers are significantly different from membranes in fluid environments.<sup>19</sup> A promising approach is to use self-assembled monolayers (SAMs) of thiol molecules on gold, since they can act as a bridge or a spacer between the inorganic surface and the assembled macromolecules. Modification of solid surfaces with a spacer to link phospholipids bilayers provides a selective anchoring layer to accommodate hydrophilic domains of proteins and enables the charge transport from one side of the membrane to the other side.<sup>4–6,20</sup>

Concerning the inorganic surface there is a particular interest in metallic substrates because they can be used as electrodes in electrochemical-based biosensors. Gold substrates are particularly attractive because they are biocompatible and inert materials that can be modified by simple solution chemistry without significant contamination.

Several approaches have been developed to support phospholipid bilayers on gold. Hybrid bilayers of phospholipids on alkanethiol<sup>21</sup> or thiophospholipid<sup>22</sup> SAMs on gold lead to well ordered and blocking artificial membranes but they lack a proper fluidity to resemble a biomimetic system. Adding a long thiolated linker to the phospholipid tethered bilayers<sup>5,6</sup> or performing vesicle fusion over long ( $C_n > 11$ ) hydroxyl-terminated thiols<sup>20,23</sup> (as a hydrophilic surface is required for this strategy) improve fluid properties. However an increase in the length of the linker chain should hinder electron transfer.<sup>24</sup> Therefore the use of a very short spacer that turns the gold surface hydrophilic enough for vesicle fusion and allows an easy electron transfer should be a suitable choice to build an electrochemical biosensor. Unfortunately, short hydroxyalkanethiol SAMs, *e.g.* 2-mercaptoethanol, have a lower stability against reductive desorption<sup>25</sup> which greatly decrease the range of electrochemical sensing ability.

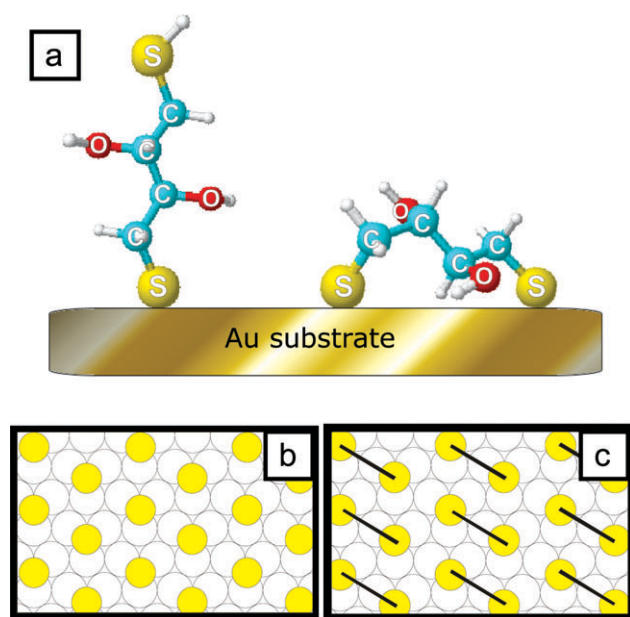
<sup>a</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas and Departamento de Física, UFSC, C. P. 476, Florianópolis, 88.040-900, Brazil.  
E-mail: pasa@fisica.ufsc.br; Fax: +55 48 3234 0599

<sup>b</sup> INIFTA, CONICET-UNLP, La Plata, CC 16 Suc. 4, Argentina.  
E-mail: mevela@inifta.unlp.edu.ar; Fax: +54 221 425 4642

<sup>c</sup> Departamento de Física, UFV, Viçosa, Brazil

According to the previously mentioned requirements, dithiothreitol (DTT) appears to be a good candidate for these purposes. In fact, it is a short  $\alpha,\omega$ -alkanedithiol with two hydroxyl groups that, if the molecule adopts a lying-down configuration, should be exposed to the environment (Fig. 1). DTT SAMs have been used to bind  $\text{Ag}^+$  cations,<sup>26</sup> to immobilize gold nanoparticles,<sup>27</sup> to study heterogeneous binding of divalent metals,<sup>28</sup> and also to provide an hydroxylated substrate for sol-gel synthesis.<sup>29</sup> It has been reported that DTT self-assembly on Au(111) changes the contact angles of a water droplet on gold from  $50^\circ$  to  $38^\circ$ .<sup>30,31</sup> Also, a related molecule, cyclo-DTT enabled the formation of an hierarchical self-assembly of proteins to a gold surface *via* the disulfide moiety and opening the S-S bond.<sup>32</sup>

In this work, we have used DTT as a sulfur bridge to separate the lipidic membranes from the gold surface. DTT self-assembled monolayers on Au(111) were characterized by its electrodesorption curves. Results from scanning tunneling microscopy (STM) show that DTT molecules induce the formation of the typical monoatomic deep pits.<sup>33</sup> From X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) data we can conclude that DTT molecules self-assemble in a lying down configuration. The OH-rich surface facilitates the formation of fluid dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) bilayer domains obtained by vesicle fusion as observed by *in situ* atomic force measurements (AFM). Electrochemical results using two molecular probes, methylene blue (MB) and flavin adenine dinucleotide (FAD), confirm that a continuous and fluid bilayer is formed on the DTT-Au surface.



**Fig. 1** (a) Representation of the DTT molecule according to a calculation using a PM3 semiempirical method. Each atom is labeled except hydrogens (white spheres). Standing up (left) and lying down (right) conformations. (b)  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° structure for S heads (top circles) in the standing up configuration on the Au(111) substrate (white circles). (c) Lying down configuration of the bidentate molecules with S heads in a  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30° lattice.

## 2. Experimental

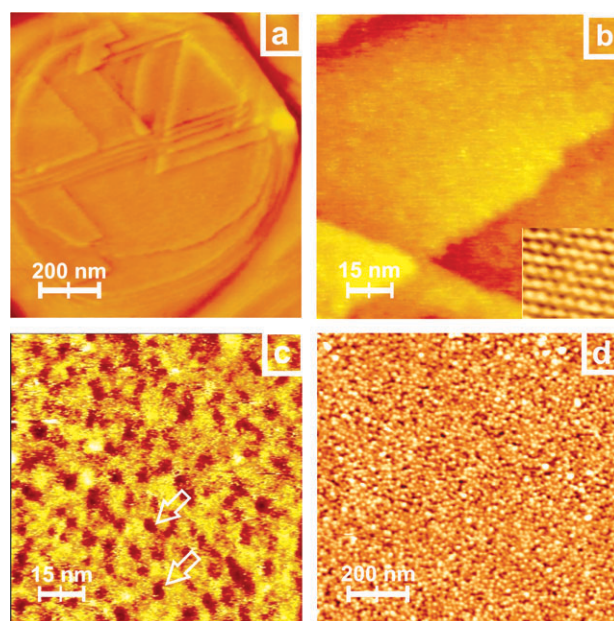
### 2.1 Substrates

Two different types of Au substrates were used. The first one was 250 nm thick gold films prepared by physical vapor deposition on a 4 nm chromium layer on glass (Gold Arrandee™). A three minute flame annealing was performed to generate a substrate consisting of atomically flat Au(111) terraces (Fig. 2a), separated by monoatomic steps. In these flat terraces atomic resolution of the Au(111) surface can be reached (Fig. 2b and inset). However, the root mean square roughness (rms) measured over  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  images is  $\approx 12$  nm due to the presence of deep grain boundaries between the atomically smooth large crystals. These substrates were used to study the self-assembly of DTT and to compare these results with those obtained for butanethiol monolayers. After DTT adsorption the typical monoatomic and diatomic deep pits formed during thiol self-assembly are observed (Fig. 2c, arrows).

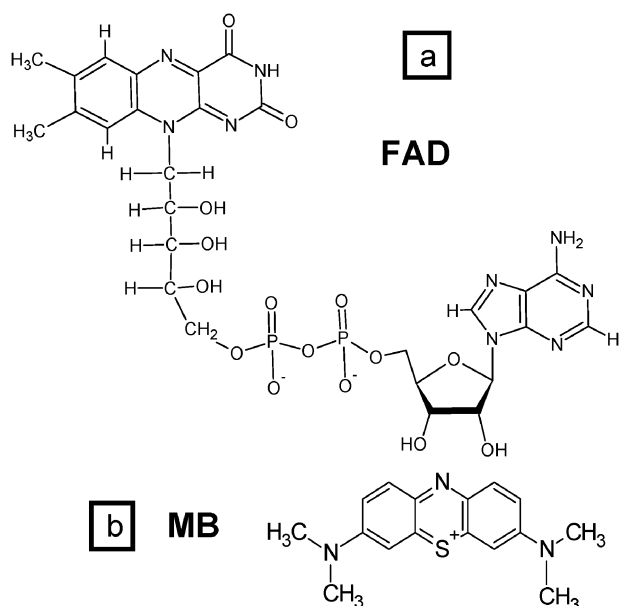
The second type of substrates were thin films of vapor-deposited Au on silicon. The film consists of small grains of 20 nm in average size (Fig. 2d). Typical root mean square roughness values measured on  $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$  images are  $\approx 3$  nm. This substrate was used to prepare the phospholipid bilayers due to its low surface roughness and the absence of deep grain boundaries.

### 2.2 Chemicals

DL-Dithiothreitol (DTT), 1-butanethiol, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and flavin adenine



**Fig. 2** (a) *Ex situ*  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$  STM image of Au Arrandee™ substrate after  $\text{H}_2$  flame annealing. (b)  $75 \text{ nm} \times 75 \text{ nm}$  STM image of smooth Au (111) terraces where atomic resolution is observed (inset  $1.7 \text{ nm} \times 1.7 \text{ nm}$ ). (c) *Ex situ*  $75 \text{ nm} \times 75 \text{ nm}$  STM image of Au Arrandee™ substrate after incubation in  $50 \mu\text{M}$  DTT ethanolic solution during 30 min at  $60^\circ\text{C}$ . Note the formation of the typical pits produced by DTT adsorption (arrows show a couple of them). (d) *Ex situ*  $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$  AFM image of gold evaporated on Si(100). The image shows that the sample consists of grains  $\sim 20$  nm in size.



**Fig. 3** (a) Flavin adenine dinucleotide and (b) methylene blue, both in their oxidized forms.

dinucleotide (FAD, Fig. 3a) were purchased from Sigma, dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) was purchased from Avanti and methylene blue (MB, Fig. 3b) from Merck. All other supplies used were of the best analytical grade commercially available.

### 2.3 Self-assembly and characterization of DTT SAMs

DTT SAMs were prepared by immersion of the gold substrates in 5 mM or 50  $\mu\text{M}$  DTT ethanolic solution either at 25  $^{\circ}\text{C}$  or 60  $^{\circ}\text{C}$  for different times ( $t$ ). Blank experiments using 50  $\mu\text{M}$  butanethiol ethanolic solutions were also performed.

DTT SAMs were then analyzed by XPS, electrochemical measurements and *ex situ* STM. XPS measurements were performed using an Mg-K $\alpha$  source (XR50, Specs GmbH) and a hemispherical electron energy analyzer (PHOIBOS 100, Specs GmbH). Spectra were acquired with 10 eV pass energy and a Shirley-type background was subtracted to each region. A two point calibration of the energy scale was performed using sputtered cleaned gold (Au 4f 7/2, binding energy = 84.00 eV) and copper (Cu 2p 3/2, binding energy = 933.67 eV) samples. C 1s at 285 eV was used as charging reference.

STM measurements were carried out with a Nanoscope IIIa (Veeco, Santa Barbara, USA). The presence of etched pits characteristic for chemisorption of thiols on gold are clearly visible (Fig. 2c). No molecular resolution was achieved under the experimental conditions used in this work.

Electrochemical measurements were performed in a conventional glass-made cell using the DTT-covered Au substrate as working electrode and a large Pt plate and a saturated calomel electrode as counter and reference electrodes, respectively, using a TEQ-2 potentiostat with data acquisition capability. Solutions were prepared with analytical-grade chemicals and Milli-Q water.

Reductive desorption measurements of DTT and butanethiol self-assembled monolayers were made following the

procedure described elsewhere.<sup>34,35</sup> Briefly, a potential sweep was applied to the SAM-covered Au substrate immersed in a three-electrode electrochemical cell containing 0.1 M NaOH at 0.05 V s $^{-1}$  from  $-0.4$  V to  $-1.4$  V.

Each solution was freshly prepared just before each series of measurements and deaerated with purified nitrogen.

### 2.4 Self-assembly of phospholipidic bilayers on DTT-covered Au substrates

DTT-covered Au prepared from 50  $\mu\text{M}$  ethanolic solution at 60  $^{\circ}\text{C}$  for  $t = 30$  min were used as substrates for supported bilayer formation by vesicle fusion.<sup>30</sup>

DMPC vesicles were obtained by evaporating, under a stream of nitrogen, the solvent of a phospholipidic solution (10 mg mL $^{-1}$ ) prepared in chloroform. The samples were dried under vacuum to eliminate solvent traces. Subsequently, multilamellar vesicles were obtained by the addition of a buffer containing 10 mM HEPES + 0.9% NaCl and vortexing. The multilamellar suspension was then extruded through a polycarbonate filter with 400 nm pore from Nuclepore to form unilamellar vesicles.<sup>36,37</sup>

DTT-covered Au substrates were immersed in 10 mg mL $^{-1}$  DMPC unilamellar vesicle suspension for 90 min at  $\sim 30$   $^{\circ}\text{C}$  (above DMPC phase transition temperature  $T_m = 23.9$   $^{\circ}\text{C}$ ) to allow vesicle fusion. The samples were then fast rinsed with 10 mM HEPES + 0.9% NaCl solution to remove the unbounded lipids, and immediately transferred to the AFM liquid cell. All AFM measurements were performed at pH 7.4 with a Molecular Imaging PicoScan microscope inside the fluid cell with temperature control, *i.e. in situ*, containing 10 mM HEPES + 0.9% NaCl, under contact mode with silicon nitride probes (triangular cantilevers with nominal spring constant of 0.12 N m $^{-1}$ , Veeco Probes). The images were analyzed using the program VS  $\times$  M 2.1 (Nanotec Electronica).

### 2.5 Electrochemical measurements with redox biomolecules

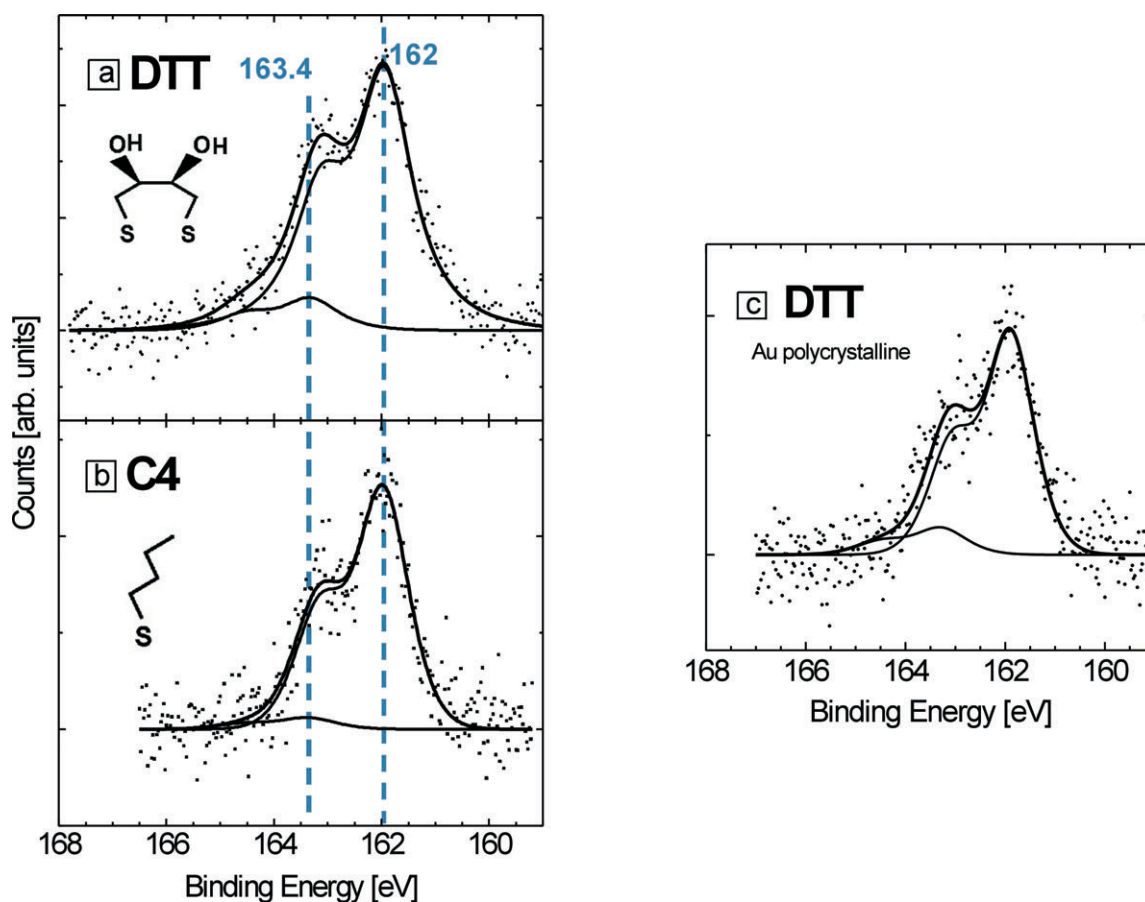
The experiments with the redox couples were performed in phosphate buffer 0.1 M pH = 7.0. The DTT–Au electrodes with or without the phospholipidic bilayer were dipped in 0.1 mM methylene blue (MB) or 0.1 mM flavin adenine dinucleotide (FAD) aqueous solutions for 30 min at  $T = 37$   $^{\circ}\text{C}$ . Potentials in the text are referred to the saturated calomel electrode (SCE).

## 3. Results and discussion

The self-assembly of DTT (DL-dithiothreitol) can be compared with the well-known self-assembly of short alkanethiolates. In principle, the DTT molecule can adopt two different configurations (standing up or lying down) on the Au(111) surface as schematically shown in Fig. 1a. Possible surface structures for those configurations considering the well-known surface structure reported for thiols,<sup>33,38</sup> dithiols<sup>39–41</sup> and DTT on Au(111)<sup>30</sup> are depicted in Fig. 1b and c.

Typical XPS data obtained for DTT-covered Au(111) surfaces prepared by immersion in 50  $\mu\text{M}$  ethanolic solutions for  $t = 30$  min at  $T = 60$   $^{\circ}\text{C}$  are shown in Fig. 4a. After self-assembly, the sample was removed from the solution, carefully





**Fig. 4** XPS spectra (S 2p) taken from different thiol adlayers: (a) 30 min DTT 50  $\mu\text{M}$  at 60  $^{\circ}\text{C}$  on Au(111), (b) 24 h butanethiol 50  $\mu\text{M}$  at 25  $^{\circ}\text{C}$  on Au(111), (c) DTT on polycrystalline gold, incubated with the same conditions as for (a). Experimental points are represented by dots and the best fits by a continuous line. Main contributions are marked with dashed lines.

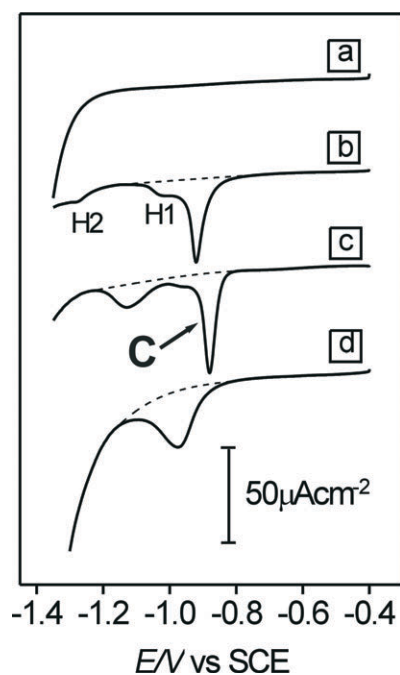
rinsed with ethanol and dried under a nitrogen flux before transferring to the UHV chamber. A broad XPS S 2p signal at 162–163 eV can be observed, a clear indication that thiols are present on the gold surface.<sup>42</sup> The S 2p signal was fitted by two doublets at 162 eV and 163.4 eV. The main component at 162 eV (Fig. 4a) corresponds to the S-head–Au covalent bonds as already reported<sup>43</sup> for different thiols on metal surfaces.<sup>42</sup> The smaller doublet at 163.4 eV corresponds to free SH groups which can be assigned either to physisorbed molecules that remain on the sample after the cleaning procedure or a small amount of molecules in standing up configuration (Fig. 1a).

Therefore, it can be concluded that the DTT molecules are chemisorbed mainly in a lying down configuration with two S-head–Au bonds per molecule (Fig. 1a, right). In fact, for DTT in the standing up configuration (Fig. 1a, left) we expect a significant contribution of the SH signal at 163.4 eV, which in this case is a minor contribution.

The S 2p (162 eV)/Au 4f signal ratio is a measure of the chemisorbed thiol coverage. We have used a self-assembled monolayer (SAM) formed on Au(111) by immersion in 50  $\mu\text{M}$  butanethiol (C4) ethanolic solutions for  $t = 24$  h (Fig. 4b) as reference system because, in this case, the SAM reaches its maximum surface coverage value  $\theta \approx 0.33$ , which corresponds to a  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30 $^{\circ}$  surface structure of alkane-thiol molecules in standing up configuration. Note that even in

this case a small contribution of physisorbed thiol molecules at 163.4 eV is observed. In the C4 SAM (Fig. 4b) the S 2p (162 eV)/Au 4f signal ratio is  $\approx 0.07$ . The spectrum shown in Fig. 4a for the DTT SAM also shows a S 2p/Au 4f signal ratio  $\approx 0.07$ , which for a dithiol in the lying down configuration (Fig. 1, right) implies  $\theta = 0.16$ . Similar results were obtained using a higher concentration (5 mM) either at the same temperature ( $T = 60$   $^{\circ}\text{C}$ ) or lower ( $T = 25$   $^{\circ}\text{C}$ ) although for this concentration a greater contribution of the 163.4 eV component was observed. On the other hand, attempts to prepare the DTT SAM from 50  $\mu\text{M}$  ethanolic solution at 25  $^{\circ}\text{C}$  for a self-assembly time of 30 min failed because we found a smaller S/Au ratio, *i.e.* the SAM does not completely cover the Au substrate. Based on the previous results we select 50  $\mu\text{M}$  and 60  $^{\circ}\text{C}$  as the best experimental conditions to form a dense layer of lying down DTT molecules able to turn the Au highly hydrophilic.

In all cases the XPS spectra (Fig. 4) show no traces of oxidized S, such as sulfonates, since no signal was observed at 167–168 eV. Ageing of the sample in ambient condition leads to degradation of the DTT layer characterized by a strong S 2p signal at binding energies  $> 167$  eV. It is interesting to note that all DTT samples exhibit a clear O 1s signal contribution arising from the OH groups of the DTT molecules (data not shown).



**Fig. 5**  $j$  vs.  $E$  profiles for the reductive desorption of DTT and butanethiol SAMs. (a) Bare Au(111), (b) Au(111) incubated 30 min in DTT 50  $\mu$ M at 60  $^{\circ}$ C, (c) Au(111) 24 h in butanethiol 50  $\mu$ M at 25  $^{\circ}$ C and (d) polycrystalline gold 30 min in DTT 50  $\mu$ M 60  $^{\circ}$ C. Measurements were made in NaOH 0.1 M at a sweep rate of 0.05 V  $s^{-1}$ .

We have obtained the same XPS results for DTT self-assembled on a vapor-deposited polycrystalline Au substrate (lying down configuration,  $\theta = 0.16$ ) as can be seen in Fig. 4c. The self-assembly of a DTT monolayer on this surface is important for the preparation of continuous lipidic bilayers. As was mentioned in the Experimental section, polycrystalline Au (see Fig. 2d) exhibits a smooth surface consisting of nanometer-sized grains. On the other hand, preferred oriented Au(111) substrates have atomically smooth surface but they have deep grain boundaries that may produce discontinuities in the DMPC bilayer.

We have performed reductive electrodesorption curves to confirm the presence of the DTT covalently attached to the gold substrate. The electrolyte used in this case was NaOH 0.1 M because at neutral pH the current peak related to the thiol electrodesorption overlaps partially with the hydrogen evolution reaction (HER). The cathodic polarization curve shown in Fig. 5a corresponds to a clean (thiol SAM-free) preferentially oriented Au (111) substrate recorded from  $-0.4$  to  $-1.4$  V. Typical double layer response of gold, without any Faradaic current contributions, is observed preceding the large cathodic current related to HER. Fig. 5b shows typical curves recorded for DTT-SAM on the Au(111) prepared from the 50  $\mu$ M ethanolic solutions for  $t = 30$  min at  $T = 60$   $^{\circ}$ C.

These polarization curves are compared with those obtained for butanethiol SAMs prepared by immersing the Au(111) substrate in 50  $\mu$ M butanethiol ethanolic solution at 25  $^{\circ}$ C for 24 h (Fig. 5c). We have also included the polarization curve corresponding to a DTT SAM on polycrystalline Au prepared

from 50  $\mu$ M ethanolic solutions for  $t = 30$  min at  $T = 60$   $^{\circ}$ C (Fig. 5d).

In all cases, the current/potential profiles recorded for the thiol SAM-covered Au substrates show well defined cathodic current peaks followed by one or two humps preceding HER. As already reported the main cathodic current peak C corresponds to the reductive thiol desorption from the Au surface according to the reaction:<sup>33</sup>



Note that the current peak recorded for DTT electrodesorption from the polycrystalline Au is broader than those recorded in the preferred (111) oriented substrate due to the presence of different crystallographic faces, grain boundaries and large amount of defects.

First, we analyze the information related to the main peak C in Fig. 5. The peak potential ( $E_p$ ) for DTT desorption from the Au(111) surface (Fig. 5b) is slightly negative in relation to that measured for a butanethiol (C4) SAM on the same substrate (Fig. 5c). Integration of the current involved in the electrodesorption peaks gives the charge density ( $q$ ) corresponding to the amount of chemisorbed species. We have obtained a charge density of  $73 \pm 10 \mu\text{C cm}^{-2}$  which is consistent with S-head-Au bonds coverage  $\approx 0.33$  taking into account reaction (1) (one electron per chemisorbed sulfur atom) and a  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30 $^{\circ}$  surface structure on the Au(111) surface. Note that this  $q$  value can be expected either for the DTT molecules chemisorbed in standing up ( $\theta = 0.33$ ) or lying down ( $\theta = 0.16$ ) configurations. Nevertheless, the standing up configuration is incompatible with XPS results (Fig. 4a).

Besides the main peak C, two humps H1 and H2 are observed at more negative potentials for DTT-SAM on Au(111). H1 is located on the negative side of the main desorption peak while H2 appears at  $-1.2$  V. In contrast, only a small peak rather than a hump at  $-1.1$  V is observed for butanethiol electrodesorption. This peak has been assigned to thiol molecules strongly chemisorbed at defects of the Au(111) surface such as steps.<sup>44</sup> Therefore, hump H2 can be assigned to DTT molecules adsorbed on Au defects. However, at present we have no clear interpretation on the origin of hump H1.

We have imaged the DTT SAM-covered Au samples by STM. Unlike butanethiol SAMs that exhibit the well-known  $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$  R30 $^{\circ}$  and  $c(4 \times 2)$  surface structures,<sup>45</sup> no molecular resolution could be achieved with DTT SAMs. As reported previously, this could be attributed to a more disordered layer.<sup>30</sup> However, DTT SAM formation can be inferred from the presence of the typical nanometer sized monoatomic and diatomic deep pits (Fig. 2c).

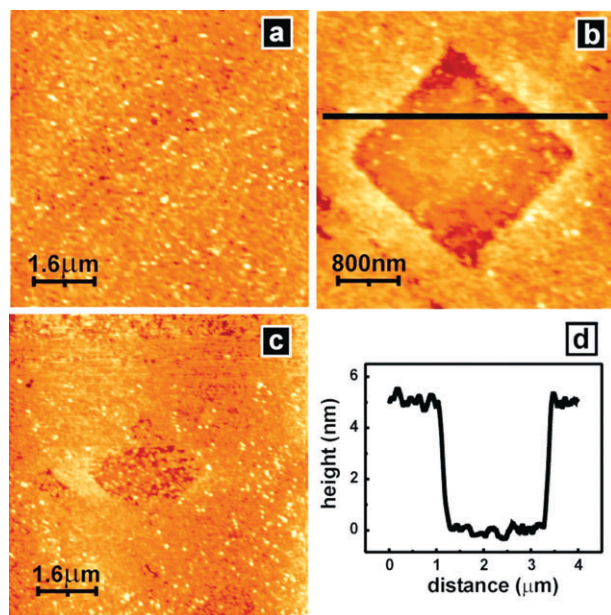
In principle, the lying down phase of DTT molecules (Fig. 1a, right) could provide a hydrophilic environment for anchoring different types of biomolecules. In the next paragraph we show that the DTT-SAMs can be used to form ordered phospholipidic bilayer domains on the polycrystalline Au surfaces. As mentioned above these substrates are particularly suitable for the formation of high quality bilayers due to its low roughness (Fig. 2d).

Fig. 6a–c shows *in situ* AFM images in buffer HEPES pH = 7.4 NaCl 0.9% of a vapor deposited polycrystalline Au covered by a DTT-SAM after immersion in a suspension of DMPC vesicles.

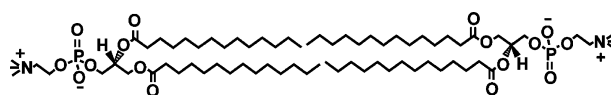
The surface morphology of the lipidic bilayer on DTT-SAM has the same characteristics (rms, grain size, *etc.*) as those exhibited by the clean polycrystalline Au substrate (Fig. 2d in Experimental section). As shown in Fig. 6a, large size areas (more than  $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ) were *in situ* scanned with the AFM tip remaining stable during the time period of the experiments ( $\approx 4\ \text{h}$ ). In order to determine the presence of the lipidic layer we have used a lithographic step by applying an additional force to the cantilever probe. This procedure removes the material present in the scanned region opening a clear squared window, as displayed in Fig. 6b. This evidences that a soft material deposit covers the DTT–Au surface. In fact, complementary XPS data (not shown) of these samples reveal P, N and C, supporting the presence of a DMPC layer.

A line scan through the opened window region (Fig. 6b) provided a thickness of about 5 nm (Fig. 6d). Note that this value is slightly higher than the expected value for a DMPC bilayer (Fig. 7) due to the hydration of the DTT–DMPC interface.<sup>8</sup> It is interesting to note that on clean Au we were unable to form a lipidic layer since vesicles remained sphere-shaped on the surface. In consequence, a highly hydroxylated surface is needed for vesicle fusion necessary to form a bilayer film.

We have also been able to image the self-healing of this layer by lateral motion of phospholipids indicating that it is not rigid at 22 °C (Fig. 6c). The sequential AFM images allow a rough estimation of the lateral diffusion coefficient ( $D$ ) of the



**Fig. 6** AFM images of DMPC bilayer formed on a lying down DTT SAM formed on polycrystalline gold. (a) Large covered area with a lipid layer. (b) Square window defined by the removal of the lipid layer using the AFM tip. (c) DMPC layer recovering the surface of the square window, taken 120 s after image (b). (d) Cross section profile corresponding to the black line of image (b).



**Fig. 7** Scheme showing two DMPC molecules linked by their lipidic tails.

phospholipids of the window (Fig. 6b and c). Taking a front displacement  $L$  for the time interval  $\Delta t$  and using  $L^2 = 2D\Delta t$  we obtained  $D \cong 10^{-11}\ \text{cm}^2\ \text{s}^{-1}$ . This value is somewhat lower than that reported for DMPC bilayers supported on glass at this temperature ( $2 \times 10^{-10}\ \text{cm}^2\ \text{s}^{-1}$ ).<sup>46</sup> The discrepancy can be explained either by a self-limiting spreading as discussed by Boxer<sup>47</sup> or by an increased interaction of DMPC with the underlying DTT/Au with respect to the glass substrate used by Smith *et al.*<sup>46</sup>

The DMPC lateral motion points toward the maintenance of membrane dynamics, which is a signal that this system could be adequate for fundamental studies in general phenomena of natural membranes, such as the incorporation of biomolecules (enzyme cofactors, proteins, drugs, *etc.*).

Concerning this point, we have tested the behavior of our DMPC bilayer–DTT–Au arrangement when it was exposed to two electrochemically active molecules: methylene blue (MB), a lipophilic molecule able to penetrate biological membranes, and flavin adenine dinucleotide (FAD), an electron carrier, that is known to be unable to diffuse across the membrane.<sup>48,49</sup> The DMPC bilayer–DTT–Au substrates were immersed for 30 min in an aqueous solution containing MB or FAD at 37 °C in order to immobilize these molecules in the fluid bilayer. Afterwards, the substrates were removed from the solution, carefully rinsed with water to eliminate the MB and FAD molecules weakly bonded to the bilayer, and finally immersed in an electrochemical cell containing phosphate buffer at pH = 7.0 to detect the presence of the redox couples corresponding to immobilized molecules. The electrochemical response of the DMPC bilayer–DTT–Au substrates exposed to MB or FAD molecules was also compared to that exhibited for the bilayer-free DTT–Au substrates exposed to the same molecules under the same experimental conditions.

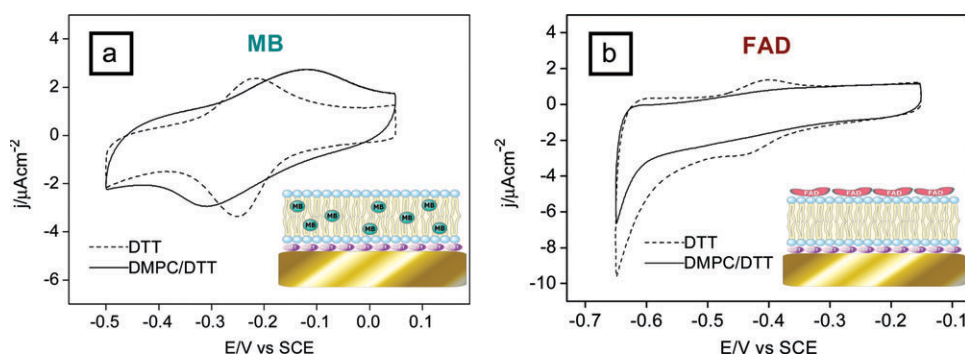
The voltammetric profiles (Fig. 8, dotted lines) show that the DTT–Au substrates have been able to immobilize certain amount of MB and FAD molecules since their redox couples are clearly observed.

On the other hand, for the DMPC bilayer–DTT–Au system only the redox couple of MB is electrochemically detected (Fig. 8, solid line) indicating that these molecules have been incorporated into the phospholipidic bilayer. The more irreversible electrochemical response of trapped MB into the bilayer demonstrates that they are placed at a larger distance from the DTT–Au substrate than in the absence of the bilayer. When FAD molecules are used as electrochemical probes, no electrochemical response is observed, *i.e.* they are not incorporated in the DMPC bilayer.

The electrochemical behavior of these molecular probes demonstrates the continuity and fluidity of our supported bilayers.

Bilayer continuity can be tested using the FAD probe. It is well established that FAD can not diffuse across membranes due to the presence of the pyrophosphate group<sup>48</sup> (Fig. 3a).





**Fig. 8** Selective permeation of biomolecules. Cyclic voltammograms performed in phosphate buffer 0.1 M pH 7.0 at scan rate:  $0.05 \text{ V s}^{-1}$ . Full lines correspond to voltammograms for DMPC bilayer–DTT–Au (111) substrates incubated 30 min either in MB 0.1 mM (a) or FAD 0.1 mM (b) aqueous solutions to immobilize these molecules. Dotted lines correspond to the voltammograms recorded for DTT–Au(111) electrodes subjected to the same procedure.

FAD could only reach the DTT–Au interface and be electrochemically detected if significant defects like pores or discontinuities were present in the bilayer.

In addition to *in situ* AFM measurements, the MB probe permits fluidity testing. Diffusion of liposoluble molecules through rigid crystalline bilayers would be largely impeded.

#### 4. Conclusions

\* DTT molecules self-assemble on Au(111) mainly in a lying down configuration irrespective of the concentration and temperature. XPS and electrochemical data indicate a DTT surface coverage  $\theta = 0.16$  with two S-head–Au covalent bonds per DTT molecule.

\* The charge density involved in the electrodesorption curves for the DTT SAMs is the same that found for alkane-thiols SAMs because the number of S-head–Au bonds remains constant.

\* The peak potential for electrodesorption indicates that the stability of the DTT SAM is similar to that observed for butanethiolate SAM.

\* DTT-SAMs on Au (111) are not highly ordered as no molecular resolution by STM was found during our STM imaging.

\* DMPC bilayer membranes can be formed on DTT–Au because the surface is highly hydroxylated. The membranes exhibit self-healing behavior.

\* The DMPC–DTT–Au system was used to test electrochemically the transport behavior of methylene blue and FAD across the bilayer, verifying that it is both fluid and continuous.

#### Acknowledgements

The authors wish to thank FAPESC, CAPES, CNPq/MCT, CONICET, ANPCyT (PICT 06-621, PAE 22771), for research grants and fellowships. V. R. de Lima is currently a PhD student of the Programa de Pós-Graduação em Química, UFSC. M. E. Vela is member of the research career of CIC BsAs.

#### References

- 1 Y. H. Chan and S. G. Boxer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007, **11**, 581–587.
- 2 E. T. Castellana and P. S. Cremer, *Surf. Sci. Rep.*, 2006, **61**, 429–444.
- 3 R. P. Richter, R. Berat and A. R. Brisson, *Langmuir*, 2006, **22**, 3497–3505.
- 4 H. Lang, C. Duschl and H. Vogel, *Langmuir*, 1994, **10**, 197–210.
- 5 R. Naumann, A. Jonczyk, C. Hampel, H. Ringsdorf, W. Knoll, N. Bunjes and P. Gräber, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1997, **42**, 241–247.
- 6 N. Bunjes, E. K. Schmidt, A. Jonczyk, F. Rippmann, D. Beyer, H. Ringsdorf, P. Gräber, W. Knoll and R. Naumann, *Langmuir*, 1997, **13**, 6188–6193.
- 7 J. Schneider, Y. F. Dufrene, W. R. Barger, Jr and G. U. Lee, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 1107–1118.
- 8 F. Tokumasu, A. J. Jin and J. A. Dvorak, *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*, 2002, **51**, 1–9.
- 9 T. Spangenberg, N. F. De Mello, T. B. Creczynski-Pasa, A. A. Pasa and H. Niehus, *Physica Status Solidi (A) Applied Research*, 2004, **201**, 857–860.
- 10 M. L. Munford, V. R. Lima, T. O. Vieira, G. Heinzelmann, T. B. Creczynski-Pasa and A. A. Pasa, *Microscopy and Microanalysis*, 2005, **11**, 90–93.
- 11 E. Sackmann and M. Tanaka, *Trends Biotechnol.*, 2000, **18**, 58–64.
- 12 L. K. Tamm and H. M. McConnell, *Biophys. J.*, 1985, **47**, 105–113.
- 13 A. Ulman, *An Introduction to Ultrathin Organic Films From Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press, Inc., San Diego, 1991.
- 14 J. Raedler, H. Strey and E. Sackmann, *Langmuir*, 1995, **11**, 4539–4548.
- 15 A. A. Brian and H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 6159–6163.
- 16 P. K. W. Mary, L. Kraft, Marjorie L. Longo, Ian D. Hutcheon and Steven G. Boxer, *Science*, 2006, **313**, 1948–1951.
- 17 R. P. Richter and A. R. Brisson, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 3422–3433.
- 18 S. Xu, G. Szymanski and J. Lipkowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 12276–12277.
- 19 F. Tokumasu, A. J. Jin, G. W. Feigenson and J. A. Dvorak, *Biophys. J.*, 2003, **84**, 2609–2618.
- 20 W. Bücking, G. A. Urban and T. Nann, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2005, **104**, 111–116.
- 21 A. L. Plant, M. Gueguetchkeri and W. Yap, *Biophys. J.*, 1994, **67**, 1126–1133.
- 22 M. B. Smith, J. Tong, J. Genzer, D. Fischer and P. K. Kilpatrick, *Langmuir*, 2006, **22**, 1919–1927.
- 23 M. Twardowski and R. G. Nuzzo, *Langmuir*, 2003, **19**, 9781–9791.
- 24 A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001.
- 25 D. E. Weisshaar, M. M. Walczak and M. D. Porter, *Langmuir*, 1993, **9**, 323–329.
- 26 B. Zeng, X. Ding, D. Pan and F. Zhao, *Talanta*, 2003, **59**, 501–507.

- 27 L. Wang, J. Bai, P. Huang, H. Wang, L. Zhang and Y. Zhao, *Electrochem. Commun.*, 2006, **8**, 1035–1040.
- 28 D. Burshtain and D. Mandler, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**, 158–164.
- 29 J. T. Banks, T. T. Yu and H. Z. Yu, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 3538–3542.
- 30 A. R. MacDairmid, M. C. Gallagher and J. T. Banks, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 9789–9792.
- 31 R. G. Nuzzo and D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 4481–4483.
- 32 H. Wackerbarth, A. Pernille Tofteng, K. J. Jensen, I. Chorkendorff and J. Ulstrup, *Langmuir*, 2006, **22**, 6661–6667.
- 33 C. Vericat, M. E. Vela, G. A. Benitez, J. A. Martin Gago, X. Torrelles and R. C. Salvarezza, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2006, **18**, R867–R900.
- 34 O. Azzaroni, M. E. Vela, G. Andreasen, P. Carro and R. C. Salvarezza, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 12267–12273.
- 35 M. E. Vela, H. Martin, C. Vericat, G. Andreasen, A. Hernández Creus and R. C. Salvarezza, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 11878–11882.
- 36 L. D. Mayer, M. J. Hope and P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **858**, 161–168.
- 37 F. Olson, C. A. Hunt, F. C. Szoka, W. J. Vail and D. Papahadjopoulos, *Biochim Biophys Acta*, 1979, **557**, 9–23.
- 38 C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo and G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 1103–1169.
- 39 M. J. Esplandiu, M. L. Carot, F. P. Cometto, V. A. Macagno and E. M. Patrito, *Surface Science*, 2006, **600**, 155–172.
- 40 M. J. Esplandiu, H. Hagenström and D. M. Kolb, *Langmuir*, 2001, **17**, 828–838.
- 41 T. Y. B. Leung, M. C. Gerstenberg, D. J. Lavrich, G. Scoles, F. Schreiber and G. E. Poirier, *Langmuir*, 2000, **16**, 549–561.
- 42 D. G. Castner, K. Hinds and D. W. Grainger, *Langmuir*, 1996, **12**, 5083–5086.
- 43 C. Vericat, M. E. Vela, G. Andreasen, R. C. Salvarezza, L. Vázquez and J. A. Martín-Gago, *Langmuir*, 2001, **17**, 4919–4924.
- 44 C. Vericat, G. Andreasen, M. E. Vela, H. Martin and R. C. Salvarezza, *J. Chem. Phys.*, 2001, **115**, 6672–6678.
- 45 F. Terán Arce, M. E. Vela, R. C. Salvarezza and A. J. Arvia, *Langmuir*, 1998, **14**, 7203–7212.
- 46 B. A. Smith and H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 2759–2763.
- 47 S. G. Boxer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, **4**, 704–709.
- 48 M. Barile, C. Brizio, D. Valenti, C. De Virgilio and S. Passarella, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 4888–4900.
- 49 F. Depeint, W. R. Bruce, N. Shangari, R. Mehta and P. J. O'Brien, *Chem. Biol. Interact.*, 2006, **163**, 94–112.

# Phospholipid Bilayers Supported on Thiolate-Covered Nanostructured Gold: In Situ Raman Spectroscopy and Electrochemistry of Redox Species

M. Antonieta Daza Millone,<sup>[b]</sup> María E. Vela,<sup>[b]</sup> Roberto C. Salvarezza,<sup>[b]</sup> Tânia B. Creczynski-Pasa,<sup>[c]</sup> Nicolás G. Tognalli,<sup>\*,[a]</sup> and Alejandro Fainstein<sup>[a]</sup>

Thiol-covered nanostructured gold has been tested as a platform for the preparation of high-area phospholipid bilayer systems suitable for optical and electrochemical sensing. In situ and ex situ Raman spectroscopy and electrochemical measurements are made to study methylene blue (MB) and flavin-adenine dinucleotide (FAD) incorporation into dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) bilayers prepared by vesicle fusion on dithiothreitol (DTT)-covered nanostructured gold. Results show

that lipophilic positively charged MB molecules are incorporated in the bilayer reaching the DTT-gold interface. On the other hand, the negatively charged FAD molecules are immobilized at the outer part of the phospholipid bilayer and cannot be electrochemically detected. Our results demonstrate that DTT-covered nanostructured gold provides a suitable high-area platform for phospholipid membranes that are able to separate and sense different kinds of molecules and biomolecules.

## 1. Introduction

Controlled design of functional biomimetic systems by self-organization has attracted considerable interest because of their wide range of potential applications that go from sensing, detection and identification devices to the development of efficient biocatalysts.<sup>[1]</sup> Also biomimetic systems are important in the field of drug carrying and drug targeting. In this context, reconstituting artificial phospholipid layers supported on solid substrates have been extensively investigated because they can be used to study, in a controlled way, basic aspects of ion, molecule and biomolecule interactions with biological materials as well as their transport across the membranes.<sup>[2,3]</sup> Phospholipid layers can also be used for exploring the interaction and transport of nanoparticles, carbon nanotubes, and other novel nanomaterials with membranes,<sup>[4]</sup> an important issue in relation to nanoscience and nanotechnological uses and concerns.

High-area solid substrates have been employed as platforms for supporting phospholipid bilayers because they provide amplification of the different signals used to detect the presence and follow the transport of species in these nanoscale environments.<sup>[5]</sup> In particular, porous nanostructured substrates are emerging as good candidates for supporting phospholipid bilayers because the membranes can retain their fluidity and they offer more interstitial free space in the pores for membrane protein incorporation or for membrane function studies. Concerning this point of view, mesoporous silicon, nanoporous ceramics and metals have been explored as promising materials. Incorporation of optically active molecular probes in membrane-covered high-area systems provides a simple way to follow structural changes under different perturbations that can be transduced into changes in optical signals.<sup>[6]</sup>

Nanostructured metals such as gold and silver are particularly interesting as platforms for supporting phospholipid bilayers

because they enable the use of electrochemical<sup>[7]</sup> and optical<sup>[8]</sup> techniques. These techniques provide in situ complementary information about interaction and transport of different molecules, biomolecules or nanomaterials in self-assembled molecular layers in contact with electrolytes.<sup>[9]</sup> The study of molecule/membrane/metal interfaces immersed in aqueous environments requires the use of these substrates to take advantage of an extremely sensitive technique like surface enhanced Raman spectroscopy (SERS).<sup>[8]</sup> SERS is a very sensitive technique that employs different types of nanostructured substrates to enhance the Raman signal produced by adsorbed and immobilized species, which is otherwise too weak to be detected with conventional Raman spectroscopy.<sup>[10]</sup> Electrochemical nanostructured gold is one example of these active substrates.<sup>[11]</sup> In SERS spectroscopy, the effective Raman cross-section can be increased by many orders of magnitude. Therefore, this technique combines the ultra-sensitive detection limit with the detailed structural information content of Raman spectroscopy.<sup>[8]</sup>

[a] Dr. N. G. Tognalli, Prof. Dr. A. Fainstein  
Laboratorio de Propiedades Ópticas  
Centro Atómico Bariloche and Instituto Balseiro, CNEA  
(8400) S. C. de Bariloche (Argentina)  
Fax: (+ 54) 2944 44 5299  
E-mail: tognalli@cab.cnea.gov.ar

[b] M. A. Daza Millone, Prof. Dr. M. E. Vela, Prof. Dr. R. C. Salvarezza  
Laboratorio de Nanoscopías y Físicoquímica de Superficies  
INIFTA, CONICET-UNLP  
CC16 Suc. 4 (1900) La Plata (Argentina)

[c] Prof. Dr. T. B. Creczynski-Pasa  
Departamento de Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC  
C. P. 476 (88.040-900) Florianópolis (Brazil)

Vesicles of phospholipids can adsorb on thiol-covered polycrystalline gold.<sup>[12]</sup> Thiol monolayers terminated with hydrophilic functional groups such as alcohols promote the adsorption and rupture of vesicles to generate patches of bilayers supported by the underlying thiol layer. On the other hand, hydrophobic methyl-terminated thiols promote the formation of hybrid bilayers formed by the thiol monolayer and a single layer of phospholipids.<sup>[12]</sup>

Recently, we have prepared fluid dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) bilayers on dithiothreitol (DTT) covered Au(111) by vesicle fusion.<sup>[13]</sup> The OH-rich DTT monolayer turns the Au surface hydrophilic enough to allow vesicle fusion<sup>[14]</sup> as revealed by in situ atomic force imaging. Methylene blue (MB) and flavin adenine dinucleotide (FAD) have been used as probes to study molecule transport across the bilayer. The possibility of DMPC bilayer formation on DTT-covered nanostructured Au is very attractive because it opens the possibility of increasing the electrical signal for amperometric detection and also allows the use of optical detection by SERS. However, some questions should be answered: Is it possible to form continuous membranes on these disordered structures that have high density of nanocolumns and nanopores? Is the high area, which practically fills the volume of the nanostructured layer, accessible to analytes? Is it possible to study the electrochemical and optical response of molecules confined in the bilayer?

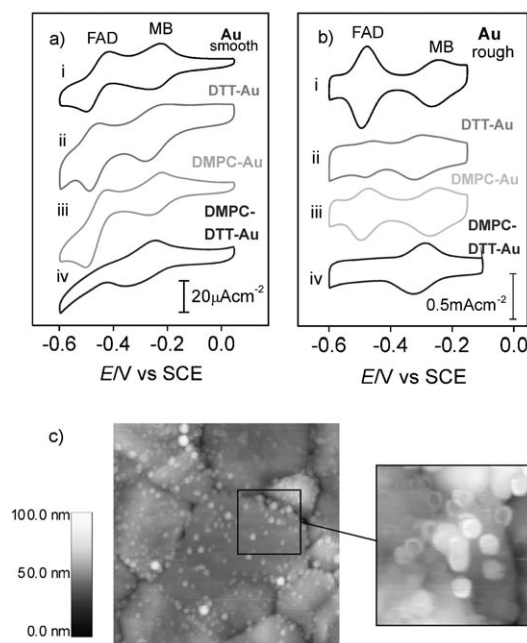
Herein we have used dithiothreitol (DTT)-covered nanostructured gold as a solid platform for phospholipid bilayer formation. We have used in situ Raman and electrochemical data to follow in real time the behavior of MB and FAD immobilized in the bilayer. In situ SERS data show that MB incorporates in the DMPC bilayer and diffuses to reach the DTT-gold surface. On the other hand, FAD remains in the outer part of the bilayer far from the DTT-gold surface being, then, electrochemically inactive. In addition, we observe FAD expelling from the bilayer to the electrolyte when the gold surface becomes negative. This seems to be related to subtle changes in the gold-phospholipid bilayer-FAD interactions induced by the applied potential. Therefore, phospholipids bilayers supported in high area nanostructured gold appear as promising systems to sense and to separate lipophilic and lipophobic species in a simple way. This can be also used as a biomimetic system to study the physical chemistry of methylene blue, or other drugs investigated as candidates for photodynamic therapy, confined in phospholipid membranes.<sup>[2]</sup>

## 2. Results and Discussion

### 2.1. DMPC-DTT-Au: Selective Electrochemical Detection

First, we have studied the ability of the DMPC-DTT-Au system for selective electrochemical detection/separation of mixtures of redox molecules in solution according to their lipophilic properties. This experiment enables to test the bilayer continuity because we expect that for a continuous system a negatively charged molecule as FAD should not reach the Au surface. Meanwhile MB should be able to diffuse across the bilayer due

to its lipophilic nature. Note that in this experiment, as FAD and MB molecules form part of the electrolytic solution, a concentration gradient could induce permeation of molecules across non-covered patches or defects reaching the Au surface where they could be electrochemically detected. For this purpose DMPC-DTT-Au either on smooth or nanostructured electrodes were immersed in mixed solutions containing  $5 \times 10^{-6}$  M MB +  $10^{-5}$  M FAD in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 solution, and cyclic voltammograms were recorded (Figures 1a,b). We



**Figure 1.** Cyclic voltammograms performed in  $5 \times 10^{-6}$  M MB +  $10^{-5}$  M FAD in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 at 25 °C for: a) smooth gold: (i) bare Au, (ii) DTT-Au, (iii) DMPC-Au and (iv) DMPC-DTT-Au at a scan rate of  $0.20 \text{ V s}^{-1}$  and for b) nanostructured (rough) gold: (i) bare Au, (ii) DTT-Au, (iii) DMPC-Au and (iv) DMPC-DTT-Au at a scan rate of  $0.10 \text{ V s}^{-1}$ . Current density is referred to the geometric area of each gold electrode. c)  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  in situ contact AFM image of the DMPC-Au surface ( $Z$  height = 100 nm). Intact DMPC vesicles and clean gold areas are clearly observed. Inset:  $1.5 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$  AFM image of vesicles ( $Z$  height = 40 nm).

have also included bare Au, DTT -Au and DMPC -Au substrates as blank experiments. For the bare Au, DTT-Au and DMPC-Au electrodes (smooth and nanostructured) both redox couples are clearly observed (Figures 1a,b i–iii). In contrast for DMPC-DTT-Au surfaces (Figures 1a,b iv) only the MB redox couple is electrochemically detected indicating that the FAD molecules have no access to the DTT-Au interface in order to participate in the charge-transfer process due to the presence of the DMPC bilayer. Also, the fact that the FAD redox couple is not inhibited on the DMPC-Au substrate (Figures 1a,b iii) demonstrates the key role of the DTT monolayer to form a continuous bilayer by providing a hydrophilic surface for the vesicle fusion. In fact, in situ AFM images of the DMPC-Au (smooth substrate) show intact vesicles on the substrate (Figure 1 c) indicating that the continuous bilayer is not formed on the bare Au under our experimental conditions. Note that the vesicles

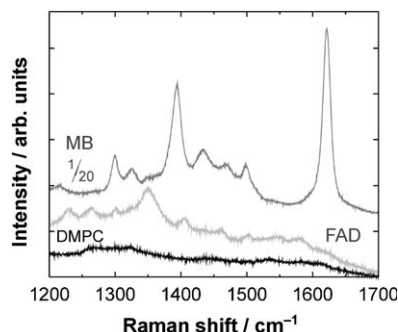
are constituted by a soft material and the tip causes a typical concave deformation (Figure 1 c, inset) as already reported.<sup>[15]</sup>

Therefore, we can conclude that in both substrates the phospholipid bilayer is continuously hindering FAD penetration and allowing only the permeation of the lipophilic MB molecules. However, it is important to note that there is a large increase (about 25 times) in the current related to the MB redox couple in the DMPC-DDT-nanostructured Au compared to that measured for DMPC-DDT-Au(111) surface, that is, the high-area nanostructured substrate can detect smaller amount of molecules in the solution.

## 2.2. In Situ Raman Electrochemistry

In this section we will show results for combined optical and electrochemical detection of very small amounts of molecules trapped/confined in the phospholipid bilayer. As has been previously studied by Tognalli et al.,<sup>[16]</sup> submonolayer amounts of MB can be immobilized in alkanethiolate self-assembled monolayers on nanostructured Au and detected by combined electrochemistry and SERS. However, hydrophobic and hydrophilic thiols trap MB with different efficiency and at different locations of the SAM.<sup>[16]</sup> DMPC bilayers supported on DTT SAM have both hydrophilic and hydrophobic moieties, therefore MB interaction with this phospholipid bilayer system must be first analyzed.

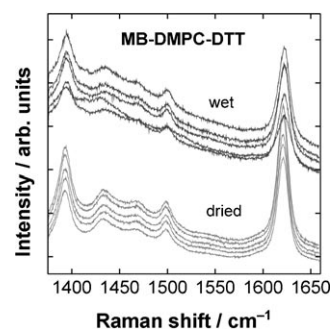
Supported DMPC bilayers exhibit no well defined signals in their spectra (Figure 2, bottom). Meanwhile, we observe the characteristic vibrational modes coming from FAD and MB



**Figure 2.** SERS spectra recorded for MB (top) and FAD (middle) immobilized in DMPC supported on DTT-covered nanostructured gold. Samples were taken in air (dried samples) with the 647.1 nm laser line. The MB intensity was divided 20 times to fit in the figure. The SERS spectra of the DMPC-DDT substrate (bottom) was also collected as a blank experiment.

when they are immobilized in DMPC supported on DTT modified gold electrodes.<sup>[17–19]</sup> The MB and FAD immobilization were performed through a 30 min incubation at 37 °C in their respective solutions. The difference in the intensity of the Raman signals between the MB and FAD spectra reflects the much larger electronic resonant enhancement of MB, as compared to FAD, for laser excitation at 647.1 nm.

In Figure 3 we present SERS spectra taken with the 568.1 nm laser line recorded for MB in DMPC supported on DTT-covered

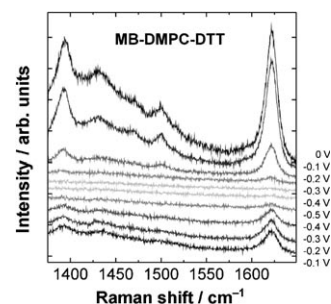


**Figure 3.** SERS spectra recorded for MB in DMPC supported on DTT-covered nanostructured gold taken in air (dried, lower) and in phosphate buffer at open circuit potential (ocp) (wet, upper). The spectra were taken with 568.1 nm laser excitation. Each spectrum was taken at a different place of the sample to show the homogenous behavior of the system.

nanostructured gold taken in air (dried) and in phosphate buffer at open circuit potential (ocp) (wet), that is, without polarization of the gold electrode. In both cases we observe the typical Raman spectra already reported for MB bonded to S and alkanethiolate self-assembled monolayers on gold surfaces.<sup>[16]</sup> The spontaneous potential reached by the system (the ocp) is  $-0.2$  V so that the MB molecule is in the oxidized state as  $\text{MB}^+$ . We note from these spectra that simple immersion of the DMPC containing MB molecules in the electrolyte solution results in a 25% decrease in the signal intensity suggesting that  $\text{MB}^+$  species can partially diffuse from the phospholipid bilayer to the electrolyte. Therefore, we conclude that this signal loss is related with “free” MB species in the DMPC bilayer.

SERS spectra in Figure 4 were acquired as a function of the applied potential during the first cyclic voltammogram in a 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 at 20 °C for the “trapped” MB molecules, that is, those MB molecules that remain in the DMPC membrane after immersion. The potential was scanned from 0 to  $-0.5$  V, and back to  $-0.1$  V, so that MB evolves from its natural oxidized state, to being fully reduced, and finally back again to its oxidized form.

The scan rate employed was  $0.01 \text{ V s}^{-1}$ , the Raman acquisition was 1 s and spectra were taken every 2 s. So each Raman



**Figure 4.** SERS spectra recorded for MB immobilized in DMPC supported on DTT-covered nanostructured gold in phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 at 20 °C as function of the applied potential during the first cyclic voltammogram. The spectra were taken with 568.1 nm laser excitation and potentials are referred to Ag/AgCl electrode.

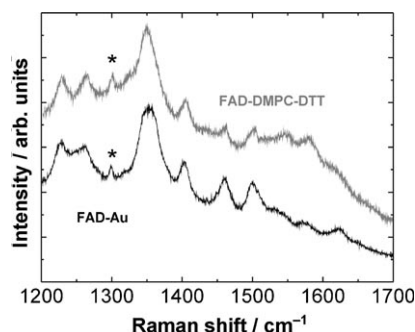


spectrum is the MB response at each specified potential. The scan rate and Raman acquisition time chosen were the best condition found as a compromise to avoid both MB diffusion to the solution and photobleaching, and registering Raman spectra with a good signal to noise ratio.

It is observed that the intensity of the peaks undergoes important changes as a function of the applied potential while the overall shape of the Raman spectra is conserved along the electrochemical run. The most important feature in the spectra is the marked decrease in the intensity that becomes null when the potential reaches  $-0.5$  V. At this potential all MB<sup>+</sup> molecules are transformed in MBH (reduced) species that are not electronic resonant for yellow (568.1 nm) excitation.

However, when the potential returns to  $-0.1$  V the intensity of the SERS signals does not recover its initial value. In fact, only about 20% of the original signal arising from the MB<sup>+</sup> species is observed after the first complete scan. Note that we have not observed substantial photobleaching either at ocp or in Raman measurements performed in situ during cyclic voltammograms performed on MB immobilized on different thiol SAMs and with similar integration times.<sup>[9]</sup> This indicates that a large number of molecules immobilized in the DMPC membrane diffuse to the solution during the first potential cycle. In contrast to the spontaneous diffusion of free MB<sup>+</sup> species observed at ocp this diffusion process is induced by the applied potential. In fact, it is well known that the leuco MBH species exhibit a weak interaction with the hydrocarbon chains, thus being free to diffuse to the electrolyte. After the rapid decay observed in the first voltammetric run the signal intensity decays only to 75% in the following potential cycles. Another interesting fact is that practically all the remaining MB molecules are electrochemically active since no background signal (as would be expected for MB molecules that remain in the oxidized state) is observed when the potential reaches  $-0.5$  V.

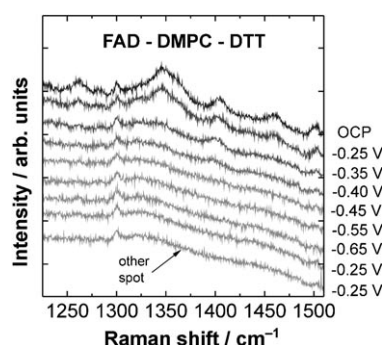
Now we discuss the behaviour of FAD molecules. SERS spectra in Figure 5 were taken in air for bare and DMPC- DTT nanostructured gold substrates after incubation with FAD solution (see Experimental Section). All peaks (except the one indicated with an asterisk which originates from a plasma line) shown in the spectra at ocp can be identified with FAD vibrations.<sup>[17]</sup> It becomes evident from the upper curve of Figure 5 that oxi-



**Figure 5.** SERS spectra recorded for FAD immobilized in DMPC supported on DTT-covered nanostructured gold and bare nanostructured gold. The spectra were taken in air (dried samples) with 647.1 nm laser excitation. The peaks indicated with asterisks originate from a plasma line.

dized FAD molecules are present in the bilayer after the incubation when the supported bilayer-gold surface is at its open circuit potential. It follows from Figure 5 that we observe similar SERS intensities for FAD-Au as compared to FAD immobilized in the bilayer. However, we know that SERS amplification depends on the distance to the substrate,<sup>[16]</sup> and no FAD redox couple have been observed in the DMPC supported system (Figure 1). These results could imply either the presence of a larger amount of FAD in the phospholipid bilayer modified substrate, or in addition some penetration of the molecules in the outer part of the bilayers that are far enough to participate in charge-transfer processes. In any case, from the SERS data in Figure 5 we can conclude that FAD is immobilized on the DMPC- DTT-gold system at least as efficiently as on the nanostructured gold without the bilayer.

We have taken in situ SERS spectra in phosphate buffer at ocp and at different applied potentials after immobilization of FAD molecules in the DMPC bilayer. The spectra recorded at ocp (Figure 6) clearly demonstrate that oxidized FAD molecules



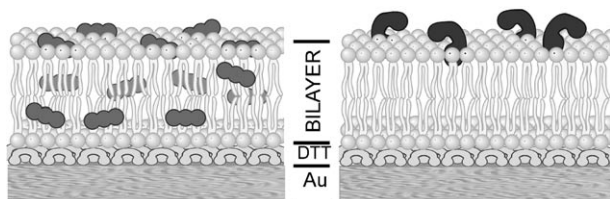
**Figure 6.** SERS spectra recorded for FAD immobilized in DMPC supported on DTT-covered nanostructured gold in phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 at 20 °C as function of the applied potential during the first cyclic voltammogram. The spectra were taken with 647.1 nm laser excitation and potentials are referred to Ag/AgCl electrode.

are present in the bilayer after immersion in buffer solution as all peaks measured in the dry sample (Figure 5) are present. Again for the FAD molecules we observe that SERS intensity diminishes when the bilayer is immersed in the electrolyte but in this case is about 1/3 of the initial value, which is more pronounced than for the MB molecule. This decrease is related to a release of FAD molecules weakly bound to the external interface of the DMPC bilayer which are highly exposed to the electrolyte and diffuse due to the concentration gradient.

Results also indicate that when the applied potential becomes more negative than  $-0.25$  V the SERS signals decrease, and finally they completely disappear at  $-0.45$  V. It is interesting to note that, in contrast to MB, reduced FAD species should exhibit a resonant Raman amplification at 647.1 nm,<sup>[17]</sup> which in this case was not observed. Furthermore, reversing the potential in the anodic direction to  $-0.10$  V does not result in the recovery of the signals intensity. Therefore, all these data indicate that FAD molecules have been eliminated from the bilayer. A possible explanation for this behaviour is

that these spectra were recorded at a very slow scan rate (0.05 V steps waiting 10 min at each potential value) so that there is enough time for the weakly bound FAD molecules to diffuse to the bulk solution. Another reason is related to the applied potential that induces subtle changes in the bilayer<sup>[20–23]</sup> resulting in FAD desorption. However, we observe a similar behaviour for FAD directly immobilized either on DTT SAM or bare gold, that is, without DMPC bilayer. In this case desorption of the negatively charged FAD takes place because the applied potential of the Au surface becomes more negative than the zero charge potential.<sup>[24]</sup> Indeed, it is well known that anion desorption from the Au surfaces takes place when the potentials are more negative than the zero charge potential of gold.

From the above results we can infer that the isoalloxazine moiety of the FAD molecule could be partially incorporated in the outer phospholipids layer since it is structurally similar to the MB molecule. Meanwhile, the hydrophilic negatively charged moiety of FAD remains in contact with the electrolyte (Figure 7). On the other hand, MB molecules are incorporated



**Figure 7.** Proposed scheme for the location of MB (left) and FAD (right) molecules in the DMPC-DTT-Au system. The molecules in the outer plane of the bilayer are lost after immersion.

in the overall DMPC bilayer volume but only those located closer to the gold surface are electrochemically active (Figure 7). The rest of the molecules are more easily released to the electrolyte, first upon immersion and afterwards by electrochemical cycling as reduced MBH molecules are formed. If one considers that the permeability of MB through a phospholipid bilayer is about  $10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$ – $10^{-10} \text{ cm s}^{-1}$ <sup>[25]</sup> and the scan rate in the SERS measurements is  $0.010 \text{ V s}^{-1}$ , we can identify the confined MB with those molecules closer to the DTT-gold surface. These molecules have no time to diffuse as MBH from this interface across the membrane to the electrolyte before they are reoxidized to  $\text{MB}^+$ .<sup>[16]</sup>

Therefore, we can assume that the bilayer structure is similar on both the smooth and nanostructured substrates because the transport properties of the molecules are quite similar.

Advantages of nanostructured gold as a platform for sensing devices are evident: the electrical signal is more than one order of magnitude larger on these substrates, they exhibit SERS activity for optical detection and they act as a spongy-like material where lipophilic molecules can be preconcentrated thus improving the detection limit. Finally, recent XPS data show that the rate of thiol oxidation on nanostructured Au is smaller than in planar Au,<sup>[26]</sup> entailing that the stability of the

overall system can also be improved by the use of rough substrates.

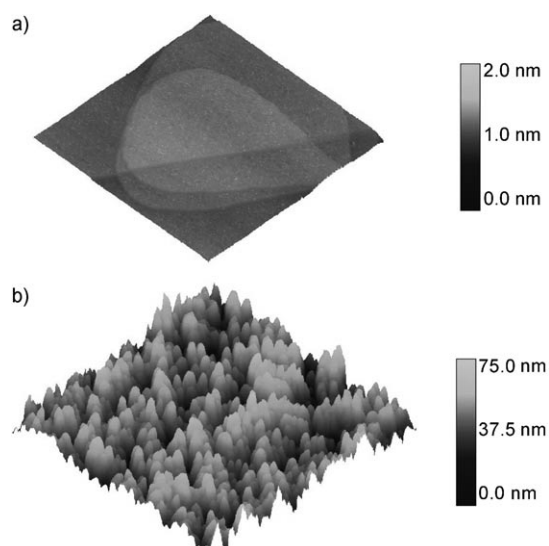
### 3. Conclusions

- DTT-covered nanostructured gold can be used to prepare phospholipid bilayers. The DTT SAM allows charge transfer turning the system suitable for electrochemical sensing.
- We test the quality of the DMPC bilayer for optical and electrochemical sensing using the positively charged lipophilic MB and the negatively charged lipophobic FAD.
- Our results demonstrate that MB molecules easily penetrate the phospholipids bilayer diffusing to the DTT-gold interface where they are detected by voltammetry. In contrast, FAD molecules remain immobilized at the outer part of the bilayer. They are expelled to the electrolyte as the gold surface becomes negative.
- Three different behaviours can be observed for MB: 1) free MB species, that diffuse to the electrolyte in the absence of MB in solution, 2) MB molecules that are removed from the phospholipid bilayer only when they are reduced to the leuco MBH species, 3) MB molecules that remain confined in the bilayer.
- DTT-covered nanostructured gold provides a suitable high area platform for phospholipid bilayers. The DMPC-DTT-nanostructured gold separates lipophilic from lipophobic molecules allowing their detection by electrochemical and optical method.

### Experimental Section

We have performed experiments with dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) bilayers supported on dithiothreitol (DTT)-covered gold substrates and we test them against a mixed solution of MB and FAD. In addition, both molecules were separately immobilized in order to understand its interaction with the DMPC bilayer.

**Substrate Preparation:** Two different types of Au substrates were used. 1) Smooth gold: Polycrystalline gold films (250 nm in thickness) were prepared by physical vapor deposition on a 4 nm chromium layer on glass (Gold Arrandee™). A three minute flame annealing was performed to generate micrometer sized crystals separated by deep grain boundaries. Software analysis of  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  images gives a root mean square (RMS) roughness of  $\sim 12 \text{ nm}$ . The micrometer sized crystals exhibit atomically smooth Au(111) terraces, separated by monoatomic steps<sup>[27]</sup> (Figure 8a). 2) Nanostructured gold (Figure 8b): SERS active nanostructured gold was prepared by the electrochemical roughening procedure described in ref. [11]. Briefly, a thick hydrous Au oxide film is formed by anodization of Au at a relatively high applied potential followed by voltammetric electroreduction. Au foils 99.99% purity were used, that were immersed in a 0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution and held for 15 min at 2.4 V (vs SCE as reference electrode). Finally, the potential was scanned down to  $-0.6 \text{ V}$  at a rate of  $0.025 \text{ V s}^{-1}$ . The surface of the resulting electrodes consists of 10 to 20 nm Au nanosized grains while the thickness reaches 650–1000 nm.<sup>[28]</sup> The RMS measured by STM is relatively low ( $\sim 85 \text{ nm}$  in  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  images) because the tip cannot penetrate the nanometer sized pores between the small crystals. The real surface area of these high area electrodes was calculated by measuring the AuO monolayer electroreduction charge



**Figure 8.** STM images in air of smooth (a) and nanostructured (b) gold, scan size: 600 nm  $\times$  600 nm.

(q),<sup>[11]</sup> considering that one monolayer involves 0.42 mC cm<sup>-2</sup>. Values of real surface area used in this work were in the 25–35 cm<sup>2</sup> range.

STM measurements of these substrates were carried out with a Nanoscope IIIa (Veeco, Santa Barbara, USA) using Pt/Ir tips. Typical measurements conditions were 0.2 V of bias potential and 1 nA of current setpoint.

**Chemicals:** DL-Dithiothreitol (DTT), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid (HEPES) and flavin adenine dinucleotide (FAD) were purchased from Sigma, dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) was purchased from Avanti and methylene blue (MB) from Merck. All other supplies used were of the best analytical grade commercially available.

**DTT-Self Assembly on Gold Substrates:** The DTT SAMs were prepared by immersion of the gold substrates in 50  $\mu$ M DTT ethanolic solution at 60 °C for 30 min. XPS and electrochemical data have shown that the DTT SAM consists of a close packed array of lying down molecules exposing the OH groups to the solution.<sup>[13]</sup> The lying down DTT molecules on the gold substrates provides the hydrophilic environment able to promote the vesicle fusion to form the phospholipid bilayer.

**Self-assembly of Phospholipidic Bilayers on DTT-Covered Gold Substrates:** DMPC vesicles were obtained by evaporating, under a stream of nitrogen, the solvent of a phospholipidic solution (10 mg mL<sup>-1</sup>) prepared in chloroform.<sup>[13]</sup> To eliminate possible traces of the solvent, the samples were dried under vacuum. Subsequently, multilamellar vesicles were obtained by the addition of a buffer containing 10 mM HEPES + 0.9% NaCl and vortexing. The multilamellar suspension was then extruded through a polycarbonate filter with 400 nm pore from Nuclepore to form unilamellar vesicles.<sup>[29,30]</sup> The DMPC bilayers were prepared by vesicle fusion on the DTT-covered gold by immersing the substrates in 10 mg mL<sup>-1</sup> DMPC vesicle suspension for 90 min at  $\sim$ 30 °C (above DMPC phase transition temperature).

Blank experiments using Au without DTT were also made. AFM measurements were performed at pH 7.4 with a Molecular Imaging PicoScan microscope inside a fluid cell with temperature control, that is, in situ, containing 10 mM HEPES + 0.9% NaCl, under con-

tact mode with silicon nitride probes (triangular cantilevers with nominal spring constant of 0.12 N m<sup>-1</sup>, Veeco Probes). The images were analyzed using the program WSxM 5.0 (Nanotec Electronics).<sup>[31]</sup>

**Immobilization of Redox Biomolecules:** DMPC supported bilayers on the DTT-covered Au substrates were dipped in 0.1 mM methylene blue (MB) or 0.1 mM flavin adenine dinucleotide (FAD) aqueous solutions for 30 min at 37 °C, a temperature where the phospholipidic bilayer is in a fluid phase. The samples were then carefully rinsed with water, dried under nitrogen flux and used for Raman and electrochemical measurements. Blank experiments using DTT-covered Au substrates were also made.

**Raman Measurements:** The Raman experiments were made in situ using a Jobin-Yvon T64000 triple spectrometer operating in subtractive mode and equipped with a liquid-N<sub>2</sub> cooled charge coupled device. The excitation was done with an Ar-Kr ion laser using energies between 1.834 eV (676 nm) and 2.707 eV (458 nm). Typical powers were around 10 mW, concentrated on a 7 mm long and  $\sim$ 100  $\mu$ m wide line focus. This was chosen to reduce the photon induced degradation of the samples. The photobleaching was determined to be less than 5% after 100 s of data acquisition. To avoid accumulating this effect, a fresh spot in the sample was used after taking each spectrum. Prior to this a Raman map of the samples was performed with very low powers and acquisition time to exclude spots displaying Raman intensities very different from the average value. To check for repeatability, five complete series of measurements were performed.

**Electrochemical Measurements:** Experiments with the redox couples were performed in a conventional electrochemical cell using a large platinum plate as counter electrode and saturated calomel as reference electrode (SCE), using a TEQ-2 potentiostat with data acquisition capability. Phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 was used as electrolyte and it was bubbled during 2 h with purified nitrogen to remove oxygen.

For the experiments with redox couples in a mixed solution, 5  $\times$  10<sup>-6</sup> M MB + 10<sup>-5</sup> M FAD in phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 were employed. Measurements made with nanostructured gold required 15 min of preconcentration in the mixed solution before performing the electrochemical experiments due to different diffusion paths in nano/microcavities with respect to smooth gold.

## Acknowledgements

We acknowledge financial support from ANPCyT (PICT 06-621), CONICET (PIP 6075) and CNPq/Prosul. This paper was made in the frame of the Interfacial, Supramolecular and Molecular Nanoscience and Nanotechnology Net (PAE 22711) and Nanoscience and Nanotechnology Net: Nanostructured Materials and Systems (Argentina). M.E.V. is a member of the research career of CIC.

**Keywords:** electrochemistry • dinucleotides • methylene blue • SERS • phospholipid

[1] C. Sanchez, H. Arribart, M. M. G. Guille, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 277–288.

[2] E. Sackmann, *Science* **1996**, *271*, 43–48.

[3] K. Tawa, K. Morigaki, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 2750–2758.

[4] S. K. Banerji, M. A. Hayes, *Langmuir* **2007**, *23*, 3305–3313.

[5] F. Cunin, P. E. Milhiet, E. Anglin, M. J. Sailor, C. Espenel, C. Le Grimallec, D. Brunel, J. M. Devoisselle, *Ultramicroscopy* **2007**, *107*, 1048–1052.

- [6] M. K. Park, A. V. Tepikin, O. H. Petersen, *Pfluegers Arch.* **2002**, *444*, 305–316.
- [7] R. C. Salvarezza, A. J. Arvia in *Modern Aspects of Electrochemistry* (Eds.: B. E. Conway, J. O. M. Bockris, R. E. White), Plenum, New York, **1996**, pp. 289–373.
- [8] M. Moskovits, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36*, 485–496.
- [9] N. G. Tognalli, A. Fainstein, C. Vericat, M. E. Vela, R. C. Salvarezza, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 3741–3746.
- [10] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *J. Phys. Condens. Matter* **2002**, *14*, R597–R624.
- [11] C. Vericat, G. A. Benitez, M. E. Vela, R. C. Salvarezza, N. G. Tognalli, A. Fainstein, *Langmuir* **2007**, *23*, 1152–1159.
- [12] C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1169.
- [13] T. B. Creczynski-Pasa, M. A. Daza Millone, M. L. Munford, V. R. d. Lima, T. O. Vieira, G. A. Benitez, A. A. Pasa, R. C. Salvarezza, M. E. Vela, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 1077–1084.
- [14] W. Caetano, P. S. Haddad, R. Itri, D. Severino, V. C. Vieira, M. S. Baptista, A. P. Schroder, C. M. Marques, *Langmuir* **2007**, *23*, 1307–1314.
- [15] G. Mao, X. Liang, K. Y. S. Ng, *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Marcel Dekker, New York, **2004**, pp. 932–942.
- [16] N. G. Tognalli, A. Fainstein, C. Vericat, M. E. Vela, R. C. Salvarezza, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 354–360.
- [17] W. D. Bowman, T. G. Spiro, *Biochemistry* **1981**, *20*, 3313–3318.
- [18] K. Hutchinson, R. E. Hester, W. J. Albery, A. R. Hillman, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1984**, 2053–2071.
- [19] R. R. Naujok, R. V. Duevel, R. M. Corn, *Langmuir* **1993**, *9*, 1771–1774.
- [20] T. C. Anglin, J. C. Conboy, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 186–193.
- [21] I. Burgess, M. Li, S. L. Horswell, G. Szymanski, J. Lipkowski, J. Majewski, S. Satija, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 1763–1776.
- [22] L. J. Jeuken, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 4711–4717.
- [23] E. A. Disalvo, F. Lairion, F. Martini, E. Tymczynszyn, M. Frias, H. Almaleck, G. J. Gordillo, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 2655–2670.
- [24] A. Hamelin in *Modern Aspects of Electrochemistry*, Vol. 16 (Eds.: B. E. Conway, R. E. White, J. O. M. Bockris), Plenum, New York, **1985**, p. 30.
- [25] A. L. Zanocco, G. Günther, E. Lemp, E. A. Lissi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, *2*, 319–324.
- [26] C. Vericat, M. E. Vela, G. A. Benitez, J. A. Martin Gago, X. Torrelles, R. C. Salvarezza, *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, R867–R900.
- [27] G. Andreasen, M. E. Vela, R. C. Salvarezza, A. J. Arvia, *Langmuir* **1997**, *13*, 6814–6819.
- [28] P. Herrasti, P. Ocón, R. C. Salvarezza, J. M. Vara, L. Vázquez, A. J. Arvia, *Electrochim. Acta* **1992**, *37*, 2209–2214.
- [29] L. D. Mayer, M. J. Hope, P. R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1986**, *858*, 161–168.
- [30] F. Olson, C. A. Hunt, F. C. Szoka, W. J. Vail, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1979**, *557*, 9–23.
- [31] I. Horcas, R. Fernandez, J. M. Gomez-Rodriguez, J. Colchero, J. Gomez-Herrero, A. M. Baro, *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78*, 013705.

Received: April 3, 2009

Revised: May 16, 2009

Published online on July 13, 2009

# Lista de ilustraciones de los capítulos

Capítulo 1: Péptido sobre mica (AFM ex situ modo contacto)

Capítulo 2: Au evaporado sobre vidrio (STM ex situ)

Capítulo 3: SAM de dodecanotiol sobre oro (STM ex situ)

Capítulo 4: FAD inmovilizado sobre una SAM de dodecanotiol (STM ex situ)

Capítulo 5: Vesículas de DMPC sobre oro (AFM in situ modo contacto)

Capítulo 6: Bicapa híbrida DMPC/DDT sobre oro (AFM in situ modo contacto intermitente)

Capítulo 7: Péptido sobre mica (AFM ex situ modo contacto)

Apéndice: Au evaporado sobre vidrio (STM ex situ)